

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



## TESIS DOCTORAL

### **Evaluación del potencial terapéutico de derivados diterpénicos de tipo kaurano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Pilar Velasco Aguirre**

Directoras

Beatriz de las Heras Polo  
Sonsoles Hortelano Blanco

**Madrid, 2014**



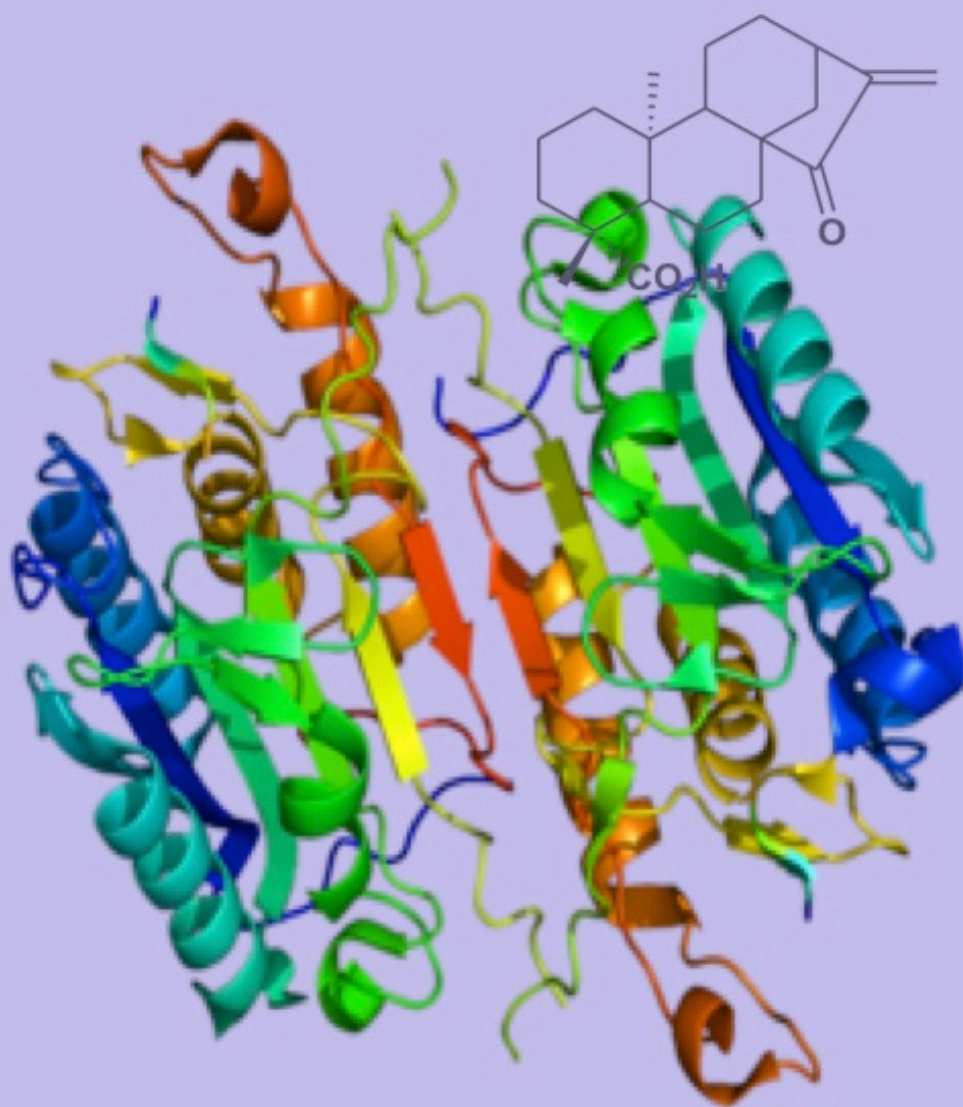
UCM

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

# EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE DERIVADOS DITERPÉNICOS DE TIPO KAURANO



Tesis Doctoral

Pilar Velasco Aguirre

Madrid, 2013





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**Evaluación del potencial terapéutico de derivados  
diterpénicos de tipo kaurano**

**TESIS DOCTORAL**

**Pilar Velasco Aguirre**  
Madrid, 2013







**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**BEATRIZ DE LAS HERAS POLO**, Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid y **SONSOLES HORTELANO BLANCO**, Científica Titular del Instituto de Salud Carlos III (ISCII).

**CERTIFICAN:**

Que la presente Tesis Doctoral presentada por **Dña. Pilar Velasco Aguirre**, titulada “Evaluación del potencial terapéutico de derivados diterpénicos de tipo kaurano” ha sido realizada en el Departamento de Farmacología bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Madrid a 14 de Octubre de 2013

Dra. Beatriz de las Heras Polo

Dra. Sonsoles Hortelano Blanco





*A mi hija Lourdes*





“...und ich betrachte seinen Tod als das letzte Opfer, das er seiner Liebe zu mir gebracht hat. Denn er ist nicht von mir gegangen, sondern für mich dahingegangen, damit, wenn möglich, noch etwas aus mir werden könne...”

Søren Kirkegaard





Durante estos años de trabajo, son muchas las personas que me han ayudado y apoyado para llevar a buen término esta Tesis y a las que quiero expresar mi agradecimiento en estas páginas.

En primer lugar, quiero dar las gracias al Departamento de Farmacología, por haberme admitido en su programa de Tesis Doctoral, dándome la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y sobre todo por la amabilidad con la que todos sus componentes me han tratado a lo largo de este tiempo y por el apoyo incondicional que he recibido de todos ellos.

Expresar mi agradecimiento a la Dra. Beatriz de las Heras, por brindarme la oportunidad de trabajar con ella y dirigir esta tesis. Gracias por su infinita paciencia, su comprensión y su ejemplo profesional y especialmente, por prestarme su apoyo incondicional, su amistad y consejos siempre que los he necesitado.

Agradecer a la Dra. Sonsoles Hortelano su inestimable ayuda, gracias a la cual me ha sido posible dar forma a esta Tesis Doctoral. Muchas gracias por su amabilidad y dedicación incondicional en todo momento.

A la Dra. Ana Estévez-Braun del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” de la Universidad de La Laguna (Tenerife), por aportar desinteresadamente los compuestos diterpénicos con los cuales se ha desarrollado este trabajo.

A mi padre, que siempre confió en mí y me inculcó la idea de que todo es posible si realmente ponemos en ello todo nuestro empeño.

A Emilio Muñoz, mi tío y tutor y ante todo la persona, que desde el principio de mi edad adulta infiltró en mi alma la curiosidad y mi pasión por la farmacología y la bioquímica.

A mi familia, que me han apoyado incondicionalmente en todas mis aventuras, aunque no comprendieran en muchas ocasiones las razones que me impulsaban a realizarlas.

A todos, mi agradecimiento.





## ABREVIATURAS

---





## Abreviaturas

<b>Ac-DEVD-AMC</b>	Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído-7-amino-4-metilcumarina
<b>Ac-IETD-AFC</b>	Acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina
<b>Ac-LEHD-AFC</b>	N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Apaf-1</b>	Factor activador de proteasa apoptótica
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sérica
<b>CHAPS</b>	(3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato)
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia enzimática
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
<b>EGTA</b>	Ácido etilen-bis tetra-acético
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FBS</b>	Suero bovino fetal
<b>GGPP</b>	Geranilgeranil pirofosfato
<b>HeLa</b>	Línea celular de cáncer de cérvix humano
<b>Hepes</b>	Ácido N-2[-hidroxietil]piperazina-N'-[2 etanosulfónico]
<b>HepG2</b>	Línea celular de carcinoma hepático humano
<b>HSP90</b>	Proteína de choque térmico
<b>HT-29</b>	Línea celular de cáncer colorrectal humano
<b>IFN-<math>\beta</math></b>	Interferón $\beta$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IoM</b>	Iomicina
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>IPP</b>	Isopentenil pirofosfato
<b>Jurkat E6</b>	Línea celular de leucemia linfocítica aguda humana
<b>MAPKs</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógeno

## Abreviaturas

<b>Mdm2</b>	Doble minuto murino
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5,difeniltetrazolio
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>Nonidet</b>	Octil-fenoxipolietoxi etanol
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3- cinasa
<b>PMA</b>	Ésteres de forbol
<b>PMN</b>	Leucocitos polimorfonucleares
<b>PMS</b>	N-metilfenacina metosulfato
<b>PMSF</b>	Fenil-Metil-Sulfonil Fluoruro
<b>RAW 264.7</b>	Línea celular macrofágica de leucemia murina
<b>ROIs</b>	Especies reactivas intermediarias de oxígeno
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>TCR</b>	Receptor de linfocitos T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TLCK</b>	N-tosil-L-lisina-clorometil cetona
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>Tris</b>	2-amino-2 (hidroximetil)-1,3 propanodiol
<b>Tween</b>	Monooleato de polioxietileno Sorbitan
<b>VPF/VEGF</b>	Factor de permeabilidad vascular/ factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>XTT</b>	[(3),2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-tetrazol-OH)]
<b>Z-VAD</b>	N-benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona



## INDICE

---







<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1. LA APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA</b>	<b>3</b>
<b>I.1.1. Apoptosis: Definición e importancia en diversos procesos patológicos .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1.2. Disminución de la apoptosis y su implicación en el cáncer</b>	<b>6</b>
<b>I.1.3. Vías del proceso apoptótico.....</b>	<b>13</b>
<b>I.1.4. Familia de Bcl-2.....</b>	<b>19</b>
<b>I.1.5. Familia de las caspasas.....</b>	<b>21</b>
<b>I.1.6. Otros factores reguladores de la apoptosis.....</b>	<b>23</b>
<b>I.1.6.1. Inhibidores de caspasas: IAPs .....</b>	<b>23</b>
<b>I.1.6.2. El gen supresor de tumores p53.....</b>	<b>24</b>
<b>I.2. LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL ORGANISMO Y SU PAPEL EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.</b>	<b>25</b>
<b>I.2.1. Sistema inmune y respuesta inmunológica.....</b>	<b>25</b>
<b>I.2.1.1. Sinopsis de la reacción inmunológica.....</b>	<b>25</b>
<b>I.2.1.2. Selección negativa y autoinmunidad.....</b>	<b>26</b>
<b>I.2.1.3. Proliferación celular y su relación con IL-2 .....</b>	<b>32</b>
<b>I.3. LOS DITERPENOS COMO AGENTES ANTITUMORALES E INMUNOMODULADORES .....</b>	<b>33</b>
<b>I.3.1. Diterpenos: Biodiversidad, estructura y clasificación.....</b>	<b>33</b>
<b>I.3.2. Actividad antitumoral de los diterpenos.....</b>	<b>38</b>
<b>I.3.2.1. Diterpenos de tipo labdano.....</b>	<b>38</b>
<b>I.3.2.2. Diterpenos de tipo kaurano.....</b>	<b>41</b>

## Introducción

<b>I.3.2.3. Otros diterpenos con actividad antitumoral.....</b>	<b>42</b>
<b>I.3.3. Actividad inmunomoduladora de los diterpenos.....</b>	<b>43</b>
<b>I.4. DITERPENOS OBJETO DE ESTUDIO .....</b>	<b>45</b>
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
<b>III.1. COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO .....</b>	<b>55</b>
<b>III.2. CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>55</b>
<b>III.2.1. Obtención y cultivo de macrófagos peritoneales.....</b>	<b>55</b>
<b>III.2.2. Cultivo de líneas celulares.....</b>	<b>56</b>
<b>III.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR .....</b>	<b>57</b>
<b>III.3.1. Ensayo de MTT.....</b>	<b>57</b>
<b>III.3.2. Ensayo de XTT.....</b>	<b>58</b>
<b>III.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>59</b>
<b>III.4.1. Preparación de extractos celulares citosólicos.....</b>	<b>59</b>
<b>III.4.2. Preparación de extractos celulares totales.....</b>	<b>59</b>
<b>III.4.3. Determinación de la concentración de proteínas.....</b>	<b>60</b>
<b>III.4.4. Análisis de proteínas por Western blot.....</b>	<b>60</b>
<b>III.4.4.1. Electroforesis y transferencia.....</b>	<b>60</b>
<b>III.4.4.2. Inmunodetección.....</b>	<b>61</b>

<b>III.5. ANÁLISIS DE APOPTOSIS.....</b>	<b>62</b>
<b>III.5.1. Análisis de apoptosis y necrosis mediante citometría de flujo</b>	<b>62</b>
<b>III.5.2. Determinación de la actividad de las caspasas.....</b>	<b>63</b>
<b>III.6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR .....</b>	<b>65</b>
<b>III.7. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....</b>	<b>66</b>
<b>III. 8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-2..</b>	<b>67</b>
<b>III. 9. REACTIVOS.....</b>	<b>68</b>
<b>III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>69</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
<b>IV.1 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTITUMORAL DE LOS DITERPENOS.....</b>	<b>73</b>
<b>IV.1.1. Efectos citotóxicos de los diterpenos objeto de estudio...</b>	<b>73</b>
<b>IV.1.2. Análisis del potencial proapoptótico de los diterpenos     12, 20, 21 y 23.....</b>	<b>76</b>
<b>IV.1.3. Estudio de los mecanismos implicados en la apoptosis     inducida por los diterpenos.....</b>	<b>78</b>
<b>IV.1.3.1. Efectos de los diterpenos 12, 20, 21 y 23 en la         expresión de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas....</b>	<b>78</b>

---

Indice

<b>IV.1.3.2.</b> Los diterpenos <b>12, 20, 21 y 23</b> activan la vía de las caspasas.....	80
<b>IV.1.4.</b> Evaluación del potencial antitumoral de los diterpenos en líneas celulares tumorales humanas.....	83
<b>IV.1.5.</b> Efectos citotóxicos de los diterpenos en células no tumorales.....	86
 <b>IV.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LOS DITERPENOS TIPO KAURANO.....</b>	 88
<b>IV.2.1.</b> Estudio de la actividad citotóxica de los compuestos <b>12, 20, 21 y 23</b> en células Jurkat.....	88
<b>IV.2.2.</b> Los compuestos <b>20 y 23</b> carecen de toxicidad sobre las células Jurkat.....	90
<b>IV.2.3.</b> Los compuestos <b>20 y 23</b> disminuyen la proliferación celular en células Jurkat.....	92
<b>IV.2.4 .</b> Los compuestos <b>20 y 23</b> inhiben la división de las células Jurkat y detienen del ciclo celular en fase Go/G1.....	94
<b>IV.2.5.</b> Los compuestos <b>20 y 23</b> disminuyen la producción de IL2	96
 <b>V. DISCUSIÓN .....</b>	 101
 <b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	 119
 <b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	 123
 <b>VIII. SUMMARY.....</b>	 137



# INTRODUCCIÓN

---







## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. LA APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

#### I.1.1. APOPTOSIS: DEFINICIÓN E IMPORTANCIA EN DIVERSOS PROCESOS PATOLÓGICOS.

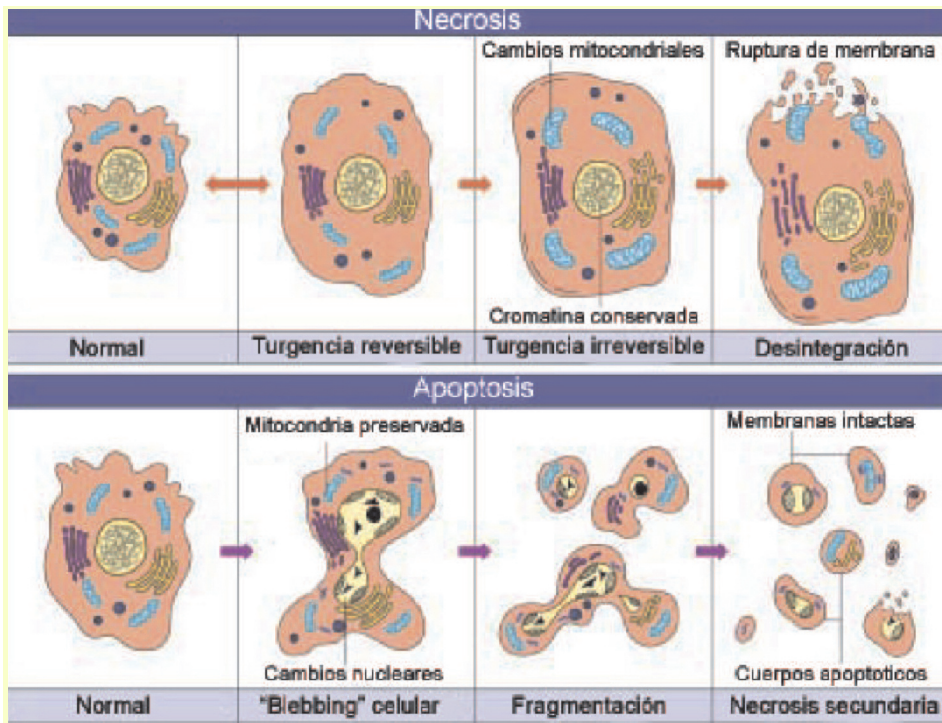
El equilibrio entre la proliferación y la muerte de las células es esencial para mantener la homeostasis de un organismo. Tradicionalmente se han descrito dos formas de muerte celular: necrosis y apoptosis (Edinger y Thompson, 2004). Durante los procesos de apoptosis y de necrosis se producen una serie de cambios bioquímicos y morfológicos.

El término **necrosis** hace referencia a un tipo de muerte celular que tiene lugar cuando se produce una lesión aguda e irreversible que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático, por la acción de sustancias químicas, de tóxicos, o por la exposición a la radiación ionizante, entre otros factores. Es un tipo de muerte celular patológica, que se caracteriza por el hinchamiento citoplasmático, la pérdida de la estructura celular y por un desequilibrio osmótico. Todo ello conduce a una alteración de la membrana citoplasmática, dando lugar a su fragmentación con la consiguiente liberación al medio del contenido celular, desarrollándose un proceso inflamatorio en el tejido adyacente (Mevorach y col., 2010).

## Introducción

Por el contrario, la **apoptosis**, o *muerte celular programada*, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. Este proceso requiere la actividad de la propia célula, ya sea a través de moléculas ya preexistentes como las proteasas de la familia de las caspasas o por medio de las especies reactivas intermediarias de oxígeno (ROIs), que producen generalmente el daño mitocondrial. Estas especies reactivas pueden a su vez reaccionar con el óxido nítrico (NO), que ha sido involucrado tanto en la modulación positiva como negativa de la apoptosis.

Inicialmente descrita por Kerr y col., (1972), de acuerdo a criterios exclusivamente morfológicos, en la apoptosis se producen una serie de cambios que alteran el propio material genético celular, proteínas nucleares y citoplasmáticas. Estos cambios incluyen la pérdida de uniones intercelulares, el deterioro de la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática, la activación de bombas iónicas de calcio, sodio y potasio y la disminución del espacio intracelular. Además, "se embebe" la célula, lo que suele ir seguido de condensación de la cromatina y coalescencia del núcleo en varias masas, previo a la fragmentación celular (Figura 1). Paralelamente se produce una degradación de casi todos los orgánulos, aunque la mitocondria, organela fundamental en la apoptosis, puede permanecer funcionalmente activa hasta el final del proceso. A continuación, la célula se divide en corpúsculos que debido a la asimetría de la membrana citoplasmática y por procesos de lipooxidación, exponen residuos de fosfatidilserina al exterior, formándose los denominados cuerpos apoptóticos que son reconocidos y fagocitados por los macrófagos circundantes, lo que permite su eliminación del medio sin generar procesos de inflamación.



**Figura 1.- Proceso de necrosis frente a proceso de apoptosis.**

En la parte superior de la figura se pueden observar los cambios morfológicos correspondientes a la muerte por necrosis, que finalizan con la ruptura de la membrana celular y la desintegración de la célula, desencadenando el proceso de inflamación. En la parte inferior los cambios se refieren a la muerte por apoptosis finalizando con la formación de cuerpos apoptóticos, que posteriormente serán retirados por los macrófagos, consiguiendo que no se produzca inflamación. Adaptado de Wagener (2010).

La apoptosis, por tanto, puede ser considerada como una muerte natural fisiológica, desempeñando de hecho un papel primordial en el mantenimiento de la homeostasis y en el desarrollo de un organismo. Por ello, los fenómenos de apoptosis son fundamentales durante el desarrollo embrionario humano, permitiendo, por ejemplo i) la formación de los dedos al inducir la muerte de las células ubicadas en las zonas interdigitales ii) el refinamiento de las conexiones nerviosas al retirar las neuronas menos capacitadas, iii) la apertura de los orificios del tubo digestivo, etc.

## Introducción

Además, en adultos la reconstrucción de estructuras en tejidos u órganos o la eliminación de células infectadas por virus o células tumorales son directamente dependientes de los procesos de apoptosis.

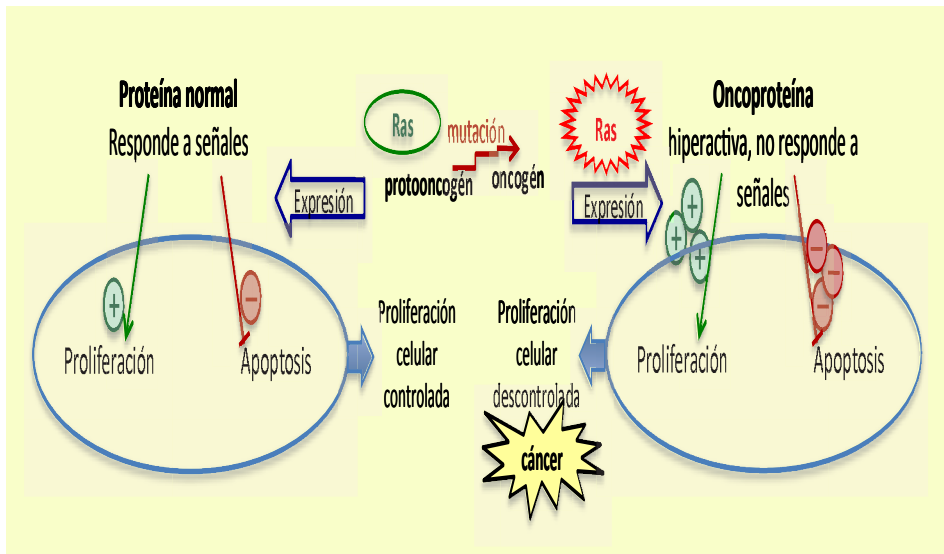
Es por ello que los procesos de apoptosis están finamente regulados, ya que tanto un exceso como un defecto en los mismos puede llevar a la aparición de diferentes patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington, esclerosis múltiple, Parkinson, enfermedades autoinmunes o procesos tumorales (Hou y col., 2012; Mattson, 2000). Por tanto, agentes que modulen este proceso pueden ser de un gran valor terapéutico.

### **I.1.2. DISMINUCIÓN DE LA APOPTOSIS Y SU IMPLICACIÓN EN EL CÁNCER.**

Uno de los avances más destacados en el conocimiento de los mecanismos implicados en el cáncer ha sido el reconocimiento de la apoptosis como una diana crucial en la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales (Kim y col., 2006).

El cáncer es un proceso caracterizado por la proliferación autónoma de las células, debida a una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadirse de mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y ciclo celular, formando un tumor con capacidad para invadir otros tejidos. Estas alteraciones a nivel de nucleótido pueden producirse por sustitución, adición o delección de los mismos (Willingham y col., 2004).

Los cambios genéticos implicados en el desarrollo tumoral se pueden resumir en los siguientes seis puntos:



**Figura 2.- Cambios genéticos implicados en el desarrollo tumoral.**

Una mutación en el gen Ras da lugar a una oncoproteína, que al ser hiperactiva no responde a señales de apoptosis, ocasionando proliferación celular descontrolada.

### 1) Capacidad de proliferación en ausencia de señales mitógenas

Las células normales requieren señales mitógenas para pasar de un estado de quiescencia a un estado de proliferación activa. Se requiere la unión de factores de crecimiento a sus receptores de superficie correspondientes. Esta señal se traduce a través de mediadores citoplasmáticos como la proteína Ras (proteína de sarcoma de rata), hasta llegar al núcleo, activando factores de transcripción que provocan la proliferación celular. Las células cancerosas generan sus propias señales de crecimiento, como ocurre, por ejemplo, en el caso de una mutación de la proteína Ras, produciéndose una proliferación celular incontrolada (Figura 2) (Hanahan y Weinberg, 2000).

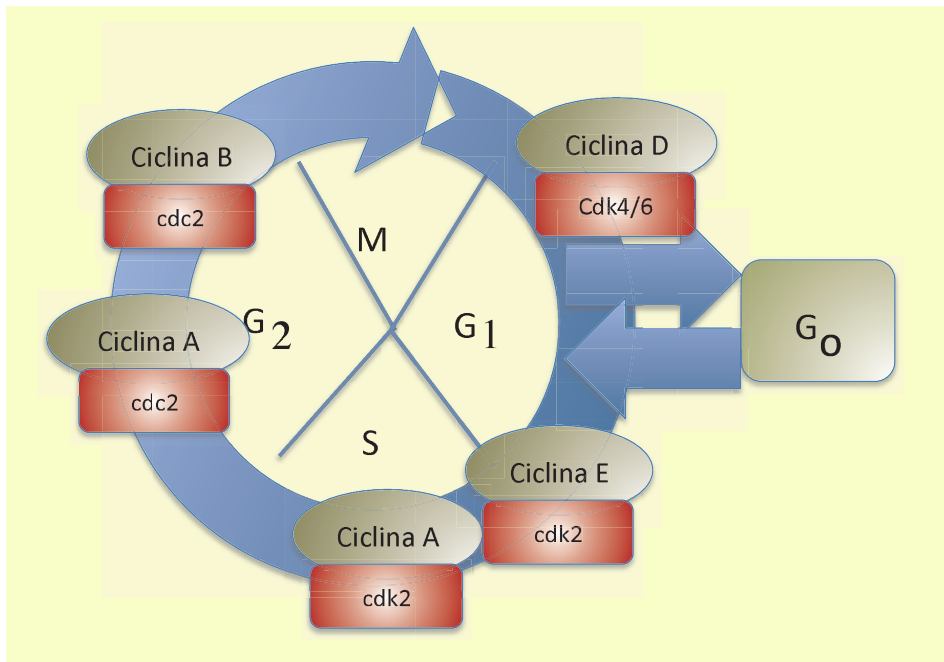
## Introducción

### 2) Falta de respuesta a señales inhibitoras de crecimiento

En un tejido normal las células se mantienen en reposo por la existencia de señales antiproliferativas y el fallo en una de estas señales puede originar un tumor. El intervalo entre cada división celular se define como ciclo celular, y se compone de cuatro fases ordenadas y estrictamente reguladas, denominadas Go/G1(fase de quiescencia), S (fase de síntesis), G2 (fase de crecimiento) y M (fase de mitosis/meiosis). Las células de mamífero quiescentes que están en reposo residen en la fase Go. Existen varios puntos de control a lo largo del ciclo celular para asegurar la replicación sin que se produzca un ácido desoxirribonucleico (ADN) defectuoso. Las *quinasas dependientes de ciclinas* (cdks) son una familia de proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular, habiéndose identificado seis familias distintas en mamíferos. Se han establecido dos tipos funcionales: las que actúan en fases G2/M (ciclinas B1 y B2) y las que actúan en fases G1/S (ciclinas D y E). La ciclina A está presente desde la fase S a la M. Cualquier fallo en los puntos de control puede ser causa de un crecimiento descontrolado (Figura 3) (Swanton, 2004).

### 3) Resistencia a la apoptosis

Como se ha descrito en el párrafo anterior, existen varios puntos de control durante el ciclo celular. En el punto de control anterior a la fase S de síntesis actúa la proteína p53 (gen supresor tumoral), cuya concentración aumenta debido a daños producidos en el ADN, deteniendo así la entrada en



**Figura 3.- Fases del ciclo celular y ciclinas implicadas.**

Para que el ciclo celular progrese es necesaria la presencia de las diferentes ciclinas unidas a su quinsa dependiente de ciclina correspondiente.

fase G1. Cualquier alteración de este comportamiento, permitirá el paso a la fase de síntesis del ADN dañado (Lane, 2004).

Las células se hacen resistentes a la apoptosis a través de distintos mecanismos. En más del 50 % de los cánceres, la pérdida de la regulación se produce por mutación del gen supresor de tumores p53, afectando a la cascada apoptótica.

#### 4) Potencial replicativo ilimitado

Los telómeros desempeñan una función crítica en el mantenimiento de la estabilidad genómica, y los efectos de su funcio-



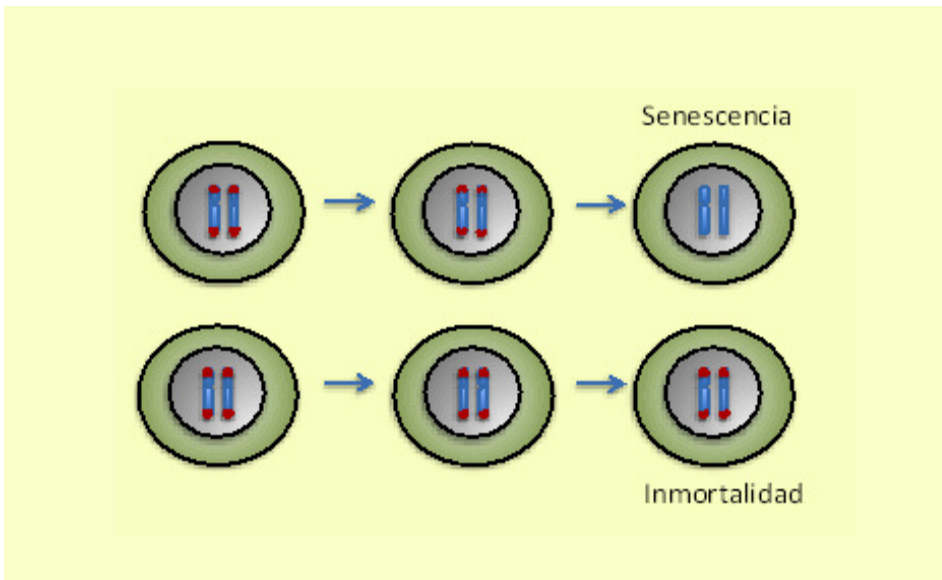
## Introducción

namiento anómalo tienen un importante impacto en procesos vitales tan relevantes como son el envejecimiento o el cáncer. Las células y tejidos somáticos normales mayoritariamente no tienen actividad telomerasa, sufriendo la pérdida gradual de ADN telomérico en cada replicación.

La longitud telomérica es una de las principales barreras contra la proliferación incontrolada, y, de hecho, el 90% de los procesos tumorales cursan en algún momento con una reactivación anómala de la actividad telomerasa. Estos datos ponen de manifiesto la estrecha dependencia de la adquisición de un potencial replicativo ilimitado y la capacidad tumorigénica de las células, si bien la mera reactivación de la telomerasa no constituye un evento transformante *per se*. Si la actividad telomerasa es elevada, la longitud del telómero se mantiene, se retrasa el envejecimiento, pero aumenta la probabilidad de padecer cáncer. La detección de niveles elevados de telomerasa se ha utilizado para el diagnóstico precoz del cáncer, por lo que la telomerasa ha constituido una potencial diana para el tratamiento de esta enfermedad. Los inhibidores de esta enzima se han utilizado como agentes antitumorales con alto grado de selectividad (Figura 4) (Buys, 2000).

### 5) Capacidad de invadir tejidos y originar metástasis

Durante su evolución, la mayor parte de los tumores adquiere la capacidad no solo de invadir tejidos adyacentes, sino también de invadir órganos distantes. La invasión tisular y la metastatización son procesos complejos en los que están implicadas



**Figura 4.- Actividad telomérica y cáncer.**

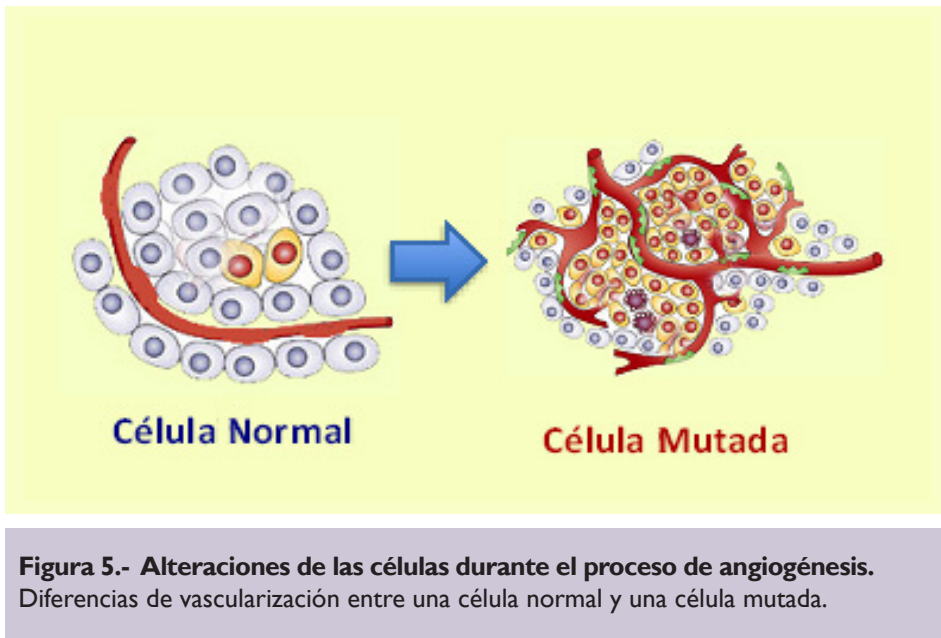
Ante una actividad telomerasa elevada, la longitud del telómero se mantiene, y la senescencia celular se retrasa, llegándose a formar células inmortales.

diferentes proteínas que intervienen en la interacción con la matriz extracelular, como  $\beta$ -catenina y la E-cadherina, cuya función se pierde en la mayor parte de las células tumorales y proteasas extracelulares, como las metaloproteasas, cuya alteración favorece la diseminación tumoral (Chaffer y Weinberg, 2011).

#### 6) Capacidad de generar angiogénesis

La angiogénesis es el proceso por el que se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Ocurre de manera fisiológica durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas.

## Introducción



La angiogénesis así mismo, facilita la expansión del tumor primario ya que proporciona un incremento del área de superficie vascular, aumentando el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos, necesarios para el mantenimiento del crecimiento descontrolado de estas células. Durante la fase prevascular la actividad angiogénica es mínima o está ausente y el tamaño del tumor no aumenta. La neovascularización comienza cuando un subgrupo de células dentro del tumor sufre un cambio hacia el fenotipo angiogénico (célula mutada), mediado por el equilibrio entre reguladores positivos como los péptidos bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) o VPF/VEGF (factor de permeabilidad vascular/factor de crecimiento del endotelio vascular) y los reguladores negativos entre los que destaca un derivado de bajo peso molecular de heparin-sufato ó interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Figura 5) (Dass, 2004).

Todas estas características que adquieren las células tumorales constituyen dianas terapéuticas en la búsqueda de nuevos fármacos. En el presente trabajo nos centraremos en el proceso de apoptosis, que se describe en profundidad a continuación.

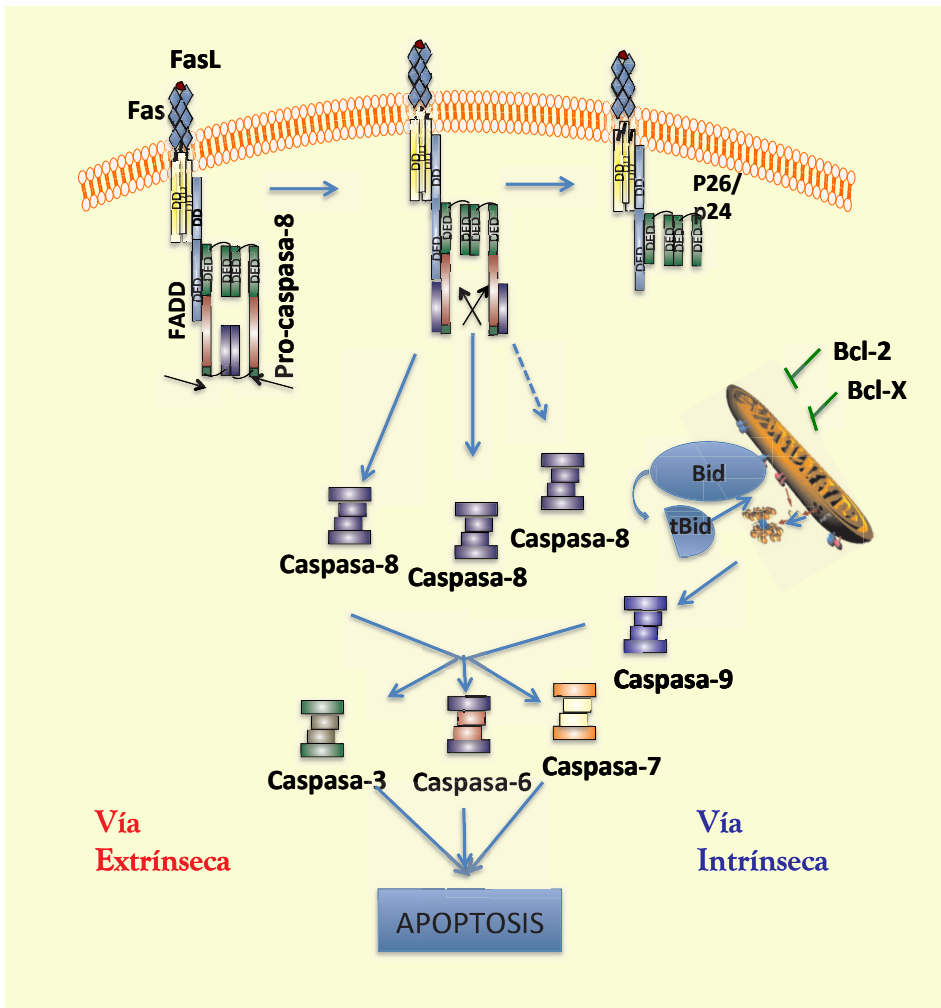
### I.1.3. VÍAS DEL PROCESO APOPTÓTICO.

El proceso apoptótico es iniciado por señales que provienen del interior de la célula. Estas señales responden a eventos que comprometen el buen funcionamiento celular dentro del entorno donde está situada: pérdida de contacto con las células que la rodean, estrés celular o señales contradictorias y simultáneas en cuanto a la puesta en marcha o no, de su ciclo de división. Ante esta situación, en que la célula es potencialmente peligrosa para el sistema donde se encuentra integrada, se pone en marcha la maquinaria de apoptosis y es eliminada.

En términos generales, en el proceso de apoptosis intervienen dos vías de señalización: la vía extrínseca o vía de los receptores de muerte y la vía intrínseca o vía mitocondrial (Figura 6).

**1.- La vía extrínseca** se inicia a través de la unión de ligandos externos a receptores de membrana denominados *receptores de muerte*. Estos últimos son proteínas transmembranales, que presentan varios dominios ricos en cisteína y pertenecen a la superfamilia del TNF (factor de necrosis tumoral). Entre ellos se incluyen TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral 1), Fas (CD95) (miembro de la superfamilia TNF), DR3/WSL, TRAIL/Apo-2L, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, (receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF).

## Introducción



**Figura 6.- Vías de apoptosis y activación de caspasas.**

El proceso de apoptosis tiene lugar a través de la vía de los receptores de muerte o de la vía mitocondrial. Ambas vías inducen la activación de las caspasas iniciadoras que convergen en las caspasas 3, 6 y 7 ejecutoras.

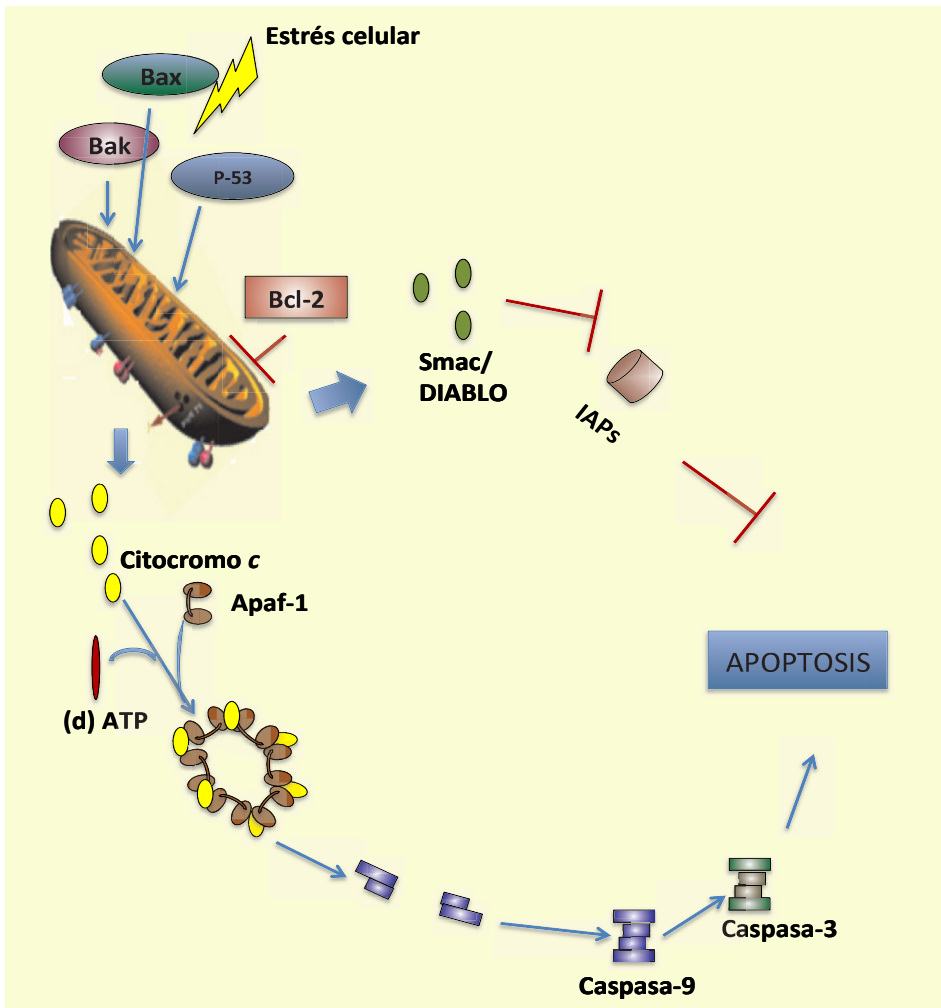
Uno de los miembros más relevantes de los receptores de muerte es CD95 o Fas. El proceso apoptótico se inicia con la unión del ligando FasL al receptor de muerte Fas que a su vez, a través de sus dominios de muerte que residen en sus colas citoplasmáticas, se une a la proteína adap-

tadoras, tipo FADD (Dominios de muerte asociados a Fas). A continuación se une la Procaspasa 8. Esta enzima contiene en su dominio N-terminal, dos tandems de DED (dominios efectores de muerte) que son los que se unen a FADD. Su región catalítica está formada por dos dominios, uno grande (20KDa) y otro pequeño (10 KDa), que darán lugar a las 2 subunidades del enzima una vez sufrida proteólisis entre los restos de cisteína y aspártico. También perderá por proteólisis su dominio N-terminal o prodominio con lo que el zimógeno pasa a la enzima activa, caspasa 8 (Enari y col., 1996; Muñoz-Pinedo, 2012).

**2.- La vía intrínseca** se inicia en el interior de la célula, en respuesta a estímulos de estrés celular, a nivel mitocondrial (Figura 7).

En esta vía, también denominada mitocondrial, el proceso se inicia directamente en la mitocondria por acción de los ROIs, NO, etc, o bien a través de moléculas mediadoras como son las ceramidas (segundos mensajeros en la señalización de la apoptosis) y otras moléculas proapoptóticas como Bax (Proteína X asociada a Bcl-2), Bad (Agonista de muerte asociado a Bcl-2), ambos miembros de la familia Bcl-2 (proteína de la célula B de linfoma 2) ó p53 (Green y Reed, 1998). La activación de esta vía de señalización se traduce en una serie de alteraciones que afectan al buen funcionamiento del orgánulo, lo que provoca la liberación de citocromo c, ruptura de la cadena de transporte de electrones, liberación de iones superóxido y una hiperpolarización de la membrana interna de la mitocondria que puede conducir a la rotura de la membrana externa mitocondrial. Así mismo, Bax al igual que otros miembros de la familia Bcl-2, puede formar un canal en la membrana de la mitocondria, que provocaría la desestabilización de esta última.

## Introducción



**Figura 7.- Esquema de la vía intrínseca del proceso de apoptosis.**

En respuesta al estrés celular, la mitocondria sufre una serie de alteraciones que conducen a la liberación del citocromo c y activación de la vía de las caspasas.

El citocromo c, una vez liberado de la mitocondria, se une a adenosin trifosfato (ATP) y Factor activador de peptidasa apoptótica (Apaf-1) formándose el denominado apoptosoma, donde la molécula Apaf-1, a través de sus regiones CARD (Dominio de reclutamiento y activación de

caspasas), quedará unida a procaspasa 9, provocando el procesamiento de esta última y obteniéndose así la procaspasa activa.

Por otro lado, esta señal de activación puede deberse a un bucle de amplificación de la vía extrínseca, como se aprecia en la Figura 6, en el que interviene la proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 denominada Bid (Dominio BH3 de interacción con dominios de muerte), que es procesada por caspasa 8 dividiéndose en dos fragmentos. Uno de ellos, el C-terminal, actúa sobre la mitocondria provocando la liberación de citocromo c con las consecuencias expuestas anteriormente, conectándose en este punto ambas vías de señalización (Li y col., 1998).

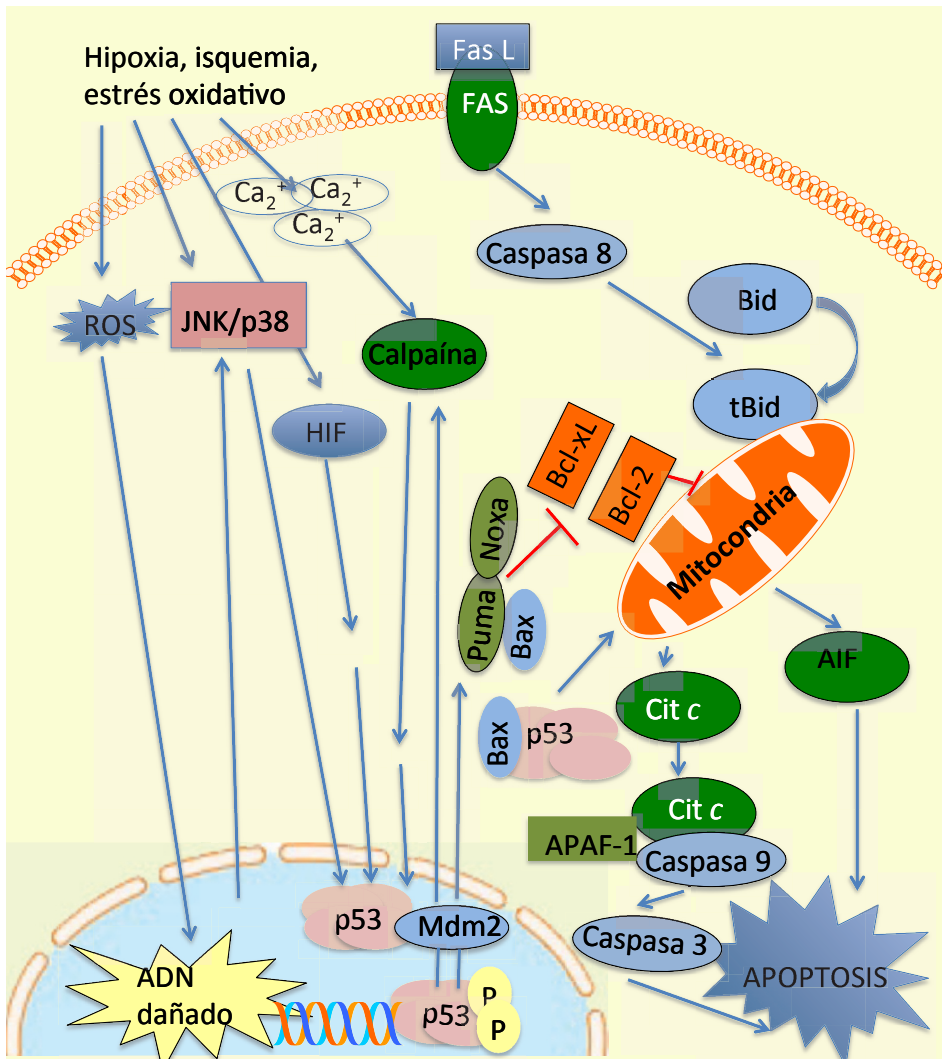
Por último, existen señales de apoptosis que tienen su inicio en el núcleo y cuyo fin es la eliminación de las células que han adquirido un carácter neoplásico, principalmente por daños en el ADN.

La respuesta está mediada por cinasas, entre las que cabe destacar la cinasa dependiente de ADN (ADN-PK). Estas cinasas actúan sobre el factor de transcripción p53, que se encuentra normalmente en niveles bajos en la célula, ya que es degradado por la proteína Mdm2 (Doble minuto murino) (Figura 8), fosforilando a una de las dos moléculas (Fridman y Lowe, 2003). La fosforilación inhibe la interacción entre ambas proteínas y, por tanto p53 se estabiliza, incrementando su expresión y activándose (Haupt y col., 2003). Esta activación puede dar lugar a dos respuestas:

- Detención del ciclo celular de forma irreversible mediante inducción de p-21, inhibidor de Cdk ó
- Apoptosis en la que está implicada la activación de genes como Bax.



## Introducción



**Figura 8.- Respuesta de distintas proteínas en el proceso de apoptosis a nivel citoplasmático y nuclear.**

Resumen de ligandos, receptores, proteínas y factores de transcripción implicados en el fenómeno de apoptosis. Adaptado de Bauer (1998).

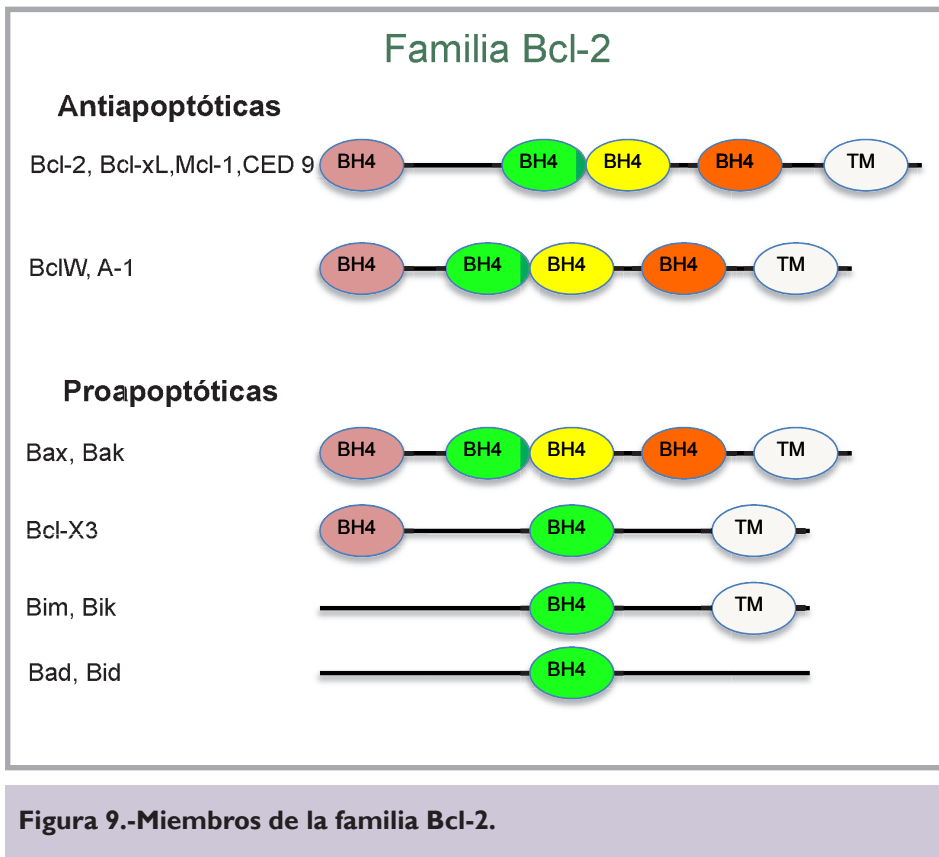
#### I.1.4. FAMILIA Bcl-2.

La familia de proteínas Bcl-2, de la cual se conocen 25 miembros, desempeña un papel primordial en la regulación de las vías apoptóticas. Se caracteriza porque todos sus miembros presentan homología con la proteína Bcl-2, que fue la primera proteína descrita y porque además presentan en su estructura al menos una de cuatro secuencias consecutivas que se numeran desde BH1 a BH4 (Droin y Green, 2004). Así, la clasificación de la familia se realiza: i) en función a su papel en el proceso apoptótico, contando con miembros pro y anti-apoptóticos o ii) en función de su estructura (número y tipo de dominios BH) (Figura 9). Dentro de los miembros antiapoptóticos se encuentran Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w y Bfl-1/A1. Todos ellos presentan cuatro dominios BH (BH1 a BH4) y evitan la permeabilización mitocondrial por medio de la interacción con otros miembros de la familia. Estos últimos, los miembros **proapoptóticos**, están divididos en dos subgrupos: los **efectores**, que poseen cuatro dominios BH (BH1 a BH4) Bax y Bak (antagonista de Bcl-2) y los “BH3-only”, que como indica su nombre en inglés, solo poseen un dominio BH3 en su estructura, Bim (mediador de muerte celular), Bid (dominio BH<sub>3</sub> de interacción con agonistas de muerte), Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk y Bik (Zinkel y col., 2006).

##### Bcl-2

Es la proteína tipo de esta familia, con un peso molecular de 26 KDa y posee los cuatro dominios que identifican a la familia, ejerciendo una función antiapoptótica. Es una proteína integral de membrana y se encuentra en la región citoplasmática de la membrana externa de la mitocondria, retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear (Ashkenazi y Dixit, 1998).

## Introducción



**Figura 9.-Miembros de la familia Bcl-2.**

### Bax

Es una proteína (21 KDa) con función proapoptótica. Posee dominios BH1, BH2 y BH3, siendo los dos primeros los que guardan homología con Bcl-2. Se localiza en diferentes tejidos y su sobreexpresión produce la aceleración de la muerte programada a través del control de flujo y permeabilidad de la mitocondria.

### Bcl-xL

Proteína estrechamente relacionada con Bcl-2, tanto en su estructura como en su función. Posee los cuatro dominios BH y su peso molecular es de 30 KDa.

Las principales funciones de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL son:

- 1) Estabilización de membranas evitando la formación de poros por heterodimerización con Bad, Bax, y por ende la liberación de citocromo c de la mitocondria.
- 2) Fijación al heterodímero Apaf-1-procaspasa 9 evitando su unión al citocromo c en el citosol y consiguiente liberación de caspasa 9.

### **1.1.5. FAMILIA DE LAS CASPASAS.**

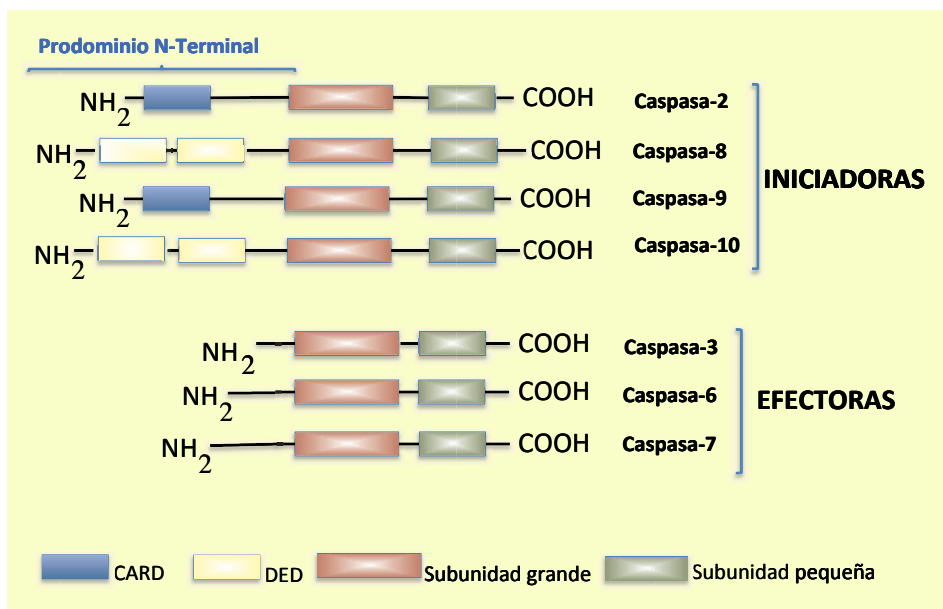
Uno de los fenómenos cruciales en el proceso de apoptosis es la activación de las caspasas. Son cisteina-proteasas con un requerimiento absoluto de cortar a nivel de un residuo de aspártico, de ahí su nombre, cisteinil-aspartato proteasas. La familia de las caspasas contiene 14 miembros en mamíferos de los que 3 no se han descrito en humanos. Todas ellas comparten similitudes en la secuencia aminoacídica, en la estructura y en la especificidad de sus sustratos. Se expresan como proenzimas sin actividad biológica y precisan de su procesamiento para activarse (Fan y col., 2005). Las procaspasas están constituidas por 3 dominios: un prodominio N-terminal, con funciones de regulación y activación y 2 subdominios que originarán la región catalítica formada por una subunidad grande (20 KDa) y otra subunidad pequeña (10 KDa) hacia el C-terminal (Stennicke y Salversen, 1998). Cuando son procesadas, pierden el prodominio N-terminal que estaba unido al siguiente dominio por un lugar de corte con aspártico, dando lugar a la subunidad grande (p20), y del mismo modo se obtiene la subunidad pequeña (p10), a través de un corte a nivel de aspártico, de manera que la enzima se activa.

## Introducción

Según la longitud del prodominio N-terminal, las caspasas se dividen en dos grandes grupos: Caspasas iniciadoras y caspasas efectoras.

- a) Las caspasas **iniciadoras** presentan prodominios largos y están involucradas en funciones de regulación durante la activación de las mismas. En sus colas se pueden encontrar repeticiones de una secuencia de interacción proteína-proteína, DED o CARDs, localizados cerca de la membrana citoplasmática, gracias a los cuales se posibilita su reclutamiento hacia el complejo formado alrededor de los receptores de superficie y señalizadores de superficie, activándose de este modo toda la cadena de proteólisis.
- b) Las caspasas **efectoras** tienen un prodominio corto, están situadas por debajo en la cadena proteolítica y están activadas por alguna de las caspasas iniciadoras. Entre ellas se encuentran las caspasas 3, 6 y 7, que actúan al final de la cascada, procesando los sustratos celulares al cortar una cisteína precedida de un aspártico, cuando dicho sustrato contenga una secuencia de reconocimiento compuesta de cuatro aminoácidos, que varía entre las diferentes caspasas, y además cuenta con una estructura terciaria tal, que pueda ser reconocida así mismo por dichas caspasas.

En general, una vez perdido el prodominio, la enzima queda activada, formando un heterodímero compuesto por una subunidad grande y una subunidad pequeña, donde ambas aportan residuos encargados tanto del reconocimiento de sustrato como de la catálisis. La forma activa es el



**Figura 10.- Clasificación de las caspasas.**

Las caspasas pueden clasificarse en dos grandes grupos : Iniciadoras y efectoras, según la longitud de sus prodominios, hacia el extremo N-terminal.

tetrámero, uniéndose dos unidades enzimáticas y, manteniendo ambos sitios activos independientes. De esta forma se produce el efecto cascada que se va amplificando cadena abajo (Figura 10) (Fan y col., 2005).

## I.1.6. OTROS FACTORES REGULADORES DE LA APOPTOSIS.

### I.1.6.1. Inhibidores de caspasas: IAPs .

Los llamados inhibidores de la apoptosis o **IAP** (proteína inhibidora de apoptosis), son una familia de proteínas integrada por 8 miembros, entre los cuales se encuentran: x-IAP, c-IAP1, c-IAP2 y MLIAP. Actúan inhibiendo de forma específica a las caspasas 9 (iniciadora), 3 y 7 (efectoras), pudiendo actuar, por tanto, en ambas rutas de señalización. Su actividad se

## Introducción

debe a la presencia de dos tipos de dominios en su estructura: un motivo BIR (repetición IAP de baculovirus) de ~70 aminoácidos y muy conservado, y un motivo de “dedos” RING en el extremo C-terminal. El motivo BIR es característico de estas proteínas y puede encontrarse repetido hasta tres veces en un miembro IAP. Tiene la capacidad de unir un átomo de zinc y es esencial para su actividad antiapoptótica.

**x-IAP** (proteína inhibidora de apoptosis ligada a cromosoma x) es una proteína de 57 KDa, que actúa bloqueando directamente la activación de las caspasas 3, 7 y 9 (Deveraux y Reed, 1999; Srinivasula y col., 2001). x-IAP posee tres motivos BIR, siendo el tercero de ellos el responsable de su unión e inhibición de caspasas.

Esta proteína a su vez es inhibida por la proteína Smac/Diablo, cuya liberación es inducida por p53.

### 1.1.6.2. El gen supresor de tumores p53.

Se ha citado ya anteriormente su función a nivel del ciclo celular. Su función en el proceso de apoptosis está también ligada a la vía intrínseca, provocando liberación de factores apoptogénicos como el citocromo c y la proteína Smac/DIABLO por la mitocondria, y a la vía extrínseca ya que la transcripción de los genes del receptor de muerte Fas y DR5 (receptor de muerte 5) y la de los correspondientes ligandos son codificados por p53. p53 posee además, la capacidad de activar Bid, estableciéndose así un puente de unión entre ambas vías (Schuler and Green, 2001; Srinivasula y col., 1998).

## I.2. LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL ORGANISMO Y SU PAPEL EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

### I.2.1. SISTEMA INMUNE Y RESPUESTA INMUNOLÓGICA.

#### I.2.1.1. Sinopsis de la reacción inmunológica.

Cuando una sustancia extraña, generalmente denominada antígeno, penetra en el organismo, se desencadenan una serie de eventos celulares que provocan la puesta en marcha de los mecanismos de defensa. Dichos mecanismos conducen a la destrucción del patógeno debida a acciones tanto celulares como humorales (Roitt y Cooke, 1987). Los mecanismos de defensa pueden ser inespecíficos o específicos.

La respuesta *inespecífica o innata* es la primera barrera defensiva del organismo, no requiere sensibilización previa y es de especial importancia en la protección del mismo frente a infecciones y cáncer. Las células que median esta respuesta inespecífica, son los leucocitos polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, macrófagos y células asesinas (NK) que son células que se caracterizan por activarse de forma inmediata siempre que cualquier sustancia extraña penetra en el organismo, como ocurre, por ejemplo, tras una herida. En este caso todas estas células se movilizan a dicho foco, reconocen y toman contacto con la sustancia extraña, que destruyen mediante el proceso de fagocitosis y citotoxicidad natural. En este tipo de respuesta participa también el sistema del complemento, formado por numerosas proteínas que se encuentran en el plasma.



## Introducción

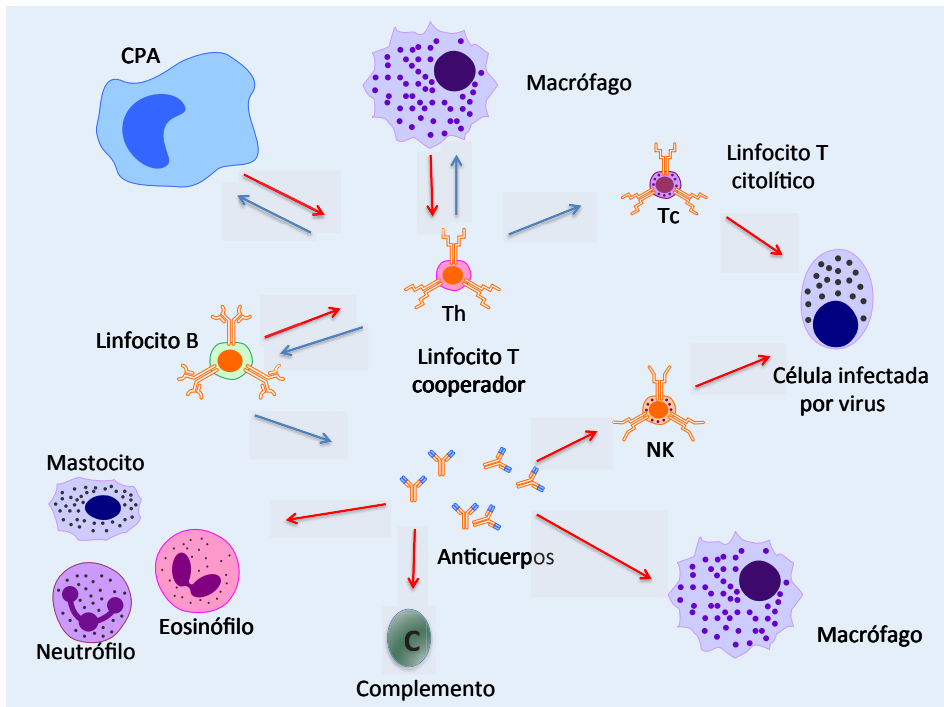
La respuesta *específica o adquirida* se desarrolla solo frente al estímulo, generalmente un antígeno, que indujo su iniciación y en ella participan de manera prioritaria los linfocitos, así como los macrófagos y células dendríticas, implicados en la presentación del antígeno a los linfocitos (Nakanishi, 2001).

Para que se inicie la respuesta inmune específica, se requiere el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos y la subsiguiente activación de los mismos. Los linfocitos B reconocen el antígeno mediante inmunoglobulinas de membrana, mientras que los linfocitos T lo reconocen mediante el TCR (Receptor de linfocitos T) (Abbas, 1987). La activación de los linfocitos B conduce a la síntesis de inmunoglobulinas por los mismos, mientras que cuando lo que se activan son los Th (linfocitos T colaboradores) o los Tc (linfocitos T citotóxicos) su función prioritaria es la producción de linfocinas o la de lisar células respectivamente. Cuando la respuesta adaptativa específica esta dirigida contra un antígeno propio, se desencadena el proceso denominado autoinmunidad (Figura 11).

### **1.2.1.2. Selección negativa y autoinmunidad.**

Todas las células que forman parte del sistema inmune se agrupan a su vez en tejidos u órganos que reciben en su conjunto el nombre de sistema linfóide. La médula ósea y el timo son los órganos responsables de llevar a cabo la linfopoyesis.

La médula ósea se encarga de la producción de los precursores de todos los tipos celulares del sistema inmune y de la maduración de los linfocitos B. Sin embargo, los linfocitos T maduran en el timo mediante procesos de selección, migrando después a los órganos linfoides secundarios. En estos órganos secundarios o periféricos coexisten diversos



**Figura 11.- Principales células implicadas en la respuesta inmune.**

leucocitos, creando las condiciones ambientales necesarias para que los linfocitos T y B puedan interactuar con otras células, para reconocer el antígeno y proporcionar una respuesta adecuada (Abbas y col., 1996).

La generación de los distintos tipos de linfocitos ocurre, sin embargo, antes e independientemente de la exposición al antígeno. Así, los linfocitos B maduran en la propia médula ósea con la participación de las células del estroma, que proporcionan ayuda vía contacto directo y vía factores solubles. Esta maduración implica el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas, que forman parte del receptor de superficie BCR (receptor de células B) y la adquisición de los distintos marcadores de superficie. Conviene destacar que no todos los linfocitos B generados salen

## Introducción

a sangre periférica, sino que sólo aquellos que no resultan potencialmente autorreactivos abandonan la médula y pasan a los órganos linfoides secundarios. El resto de los linfocitos es eliminado o inactivado por selección negativa (Goodnow, 1997).

Para determinar la autorreactividad de estos linfocitos B, éstos se enfrentan a un antígeno propio y si reconocen a éste sobre una superficie celular, su eliminación tiene lugar mediante apoptosis o muerte celular programada. A este proceso se le denomina *deleción clonal*. Sin embargo, si el antígeno reconocido es una molécula soluble, el linfocito B sufre un proceso de *anergia o inactivación clonal*. El problema es que no todos los antígenos propios están en la médula, así los linfocitos B potencialmente autorreactivos que no son eliminados o inactivados en la médula cuando son inmaduros, pueden eliminarse en la periferia ya maduros por deleción. A pesar de todo ello, el mecanismo principal que genera tolerancia periférica depende de los linfocitos Th autorreactivos, siendo éstos los que ejercen un papel principal en la tolerancia a lo propio y, por lo tanto, principales responsables de los procesos autoinmunes.

La tolerancia central se establece en estos linfocitos T mediante deleción clonal de aquellos que reconocen antígenos propios, lo que constituye la selección negativa central. Al igual que en el caso de los linfocitos B no todos los autoantígenos se encuentran en el timo por lo que son necesarios mecanismos adicionales que actúen a nivel periférico. Esta tolerancia periférica se puede establecer por diversos mecanismos:

- Las células presentadoras pueden presentar antígenos propios mediante su molécula de histocompatibilidad a los linfocitos T, pero en ausencia de proceso infeccioso, no se producen señales

coestimuladoras desde las células presentadoras hacia los linfocitos Th o de éstos a los linfocitos Tc, estableciéndose de este modo la *inactivación o anergia clonal* de los linfocitos T autorreactivos. Estas células no son eliminadas, lo que por una parte puede ser una ventaja inmunológica, pues posiblemente sean útiles en la eliminación de patógenos con antígeno estructuralmente parecido al autoantígeno, y una desventaja ya que podrían activarse de forma accidental, como se verá más adelante (Sakaguchi y col., 1996).

- La autotolerancia periférica o *immunoignorancia* se produce cuando el autoantígeno está en concentraciones no detectables por el sistema inmune, o en el caso de que los autoantígenos sean presentados a linfocitos colaboradores (CD4), que carezcan de señales coestimuladoras.
- Otra posibilidad es que los autoantígenos se encuentren en los denominados sitios inmunológicamente privilegiados. Es el caso del sistema nervioso central separado por la barrera hematoencefálica, donde existen linfocitos T y B autorreactivos funcionales, pero por *ignorancia clonal*, no llegan nunca a activarse.
- También se pueden eliminar linfocitos T autorreactivos por *delección clonal periférica*. Esto ocurre en tejidos inmunoprivilegiados como son el globo ocular, ovarios o testículos, de aparición tardía en el desarrollo. Estas células expresan el ligando FAS L (CD95L) que se une al receptor FAS (CD95) de los linfocitos Tc autorreactivos que son eliminados por apoptosis.

## Introducción

- La *tolerancia por supresión* parece deberse a los linfocitos Treg (linfocitos T reguladores), encargados de controlar y suprimir a linfocitos efectores. El proceso puede ocurrir por diversas vías, entre ellas muerte del linfocito por apoptosis debido a la liberación por parte de los linfocitos Treg de granzima A y granzima B, o inhibición de los linfocitos efectores causada por la liberación de citocinas inhibitorias como son IL-10 (interleucina 10), IL-35 y TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) (Vignali y col., 2008).

Como se puede concluir a partir de estos hechos, un fallo en cualquiera de estos mecanismos puede dar lugar a un desequilibrio entre las diferentes células del sistema inmune, lo que podría desencadenar un proceso de autoinmunidad.

Sin embargo, ésta es una forma simplista de enfocar la autoinmunidad, ya que son múltiples los equilibrios entre los diferentes tipos de linfocitos colaboradores, Th1, Th2, Th17, Treg, que están implicados en los procesos de autoinmunidad, así como factores del complemento, linfocitos B y factores ambientales capaces de desencadenar en última instancia los procesos autoinmunes.

Así, entre los factores ambientales capaces de desencadenar respuesta autoinmune en individuos con predisposición genética, se encuentran las infecciones, que aunque no producen rotura de la tolerancia central, pueden producir activación inespecífica de linfocitos T autorreactivos mediante citocinas o mediante activación previa de la célula presentadora de antígenos a través de la activación de sus moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II y de señales

coactivadoras, pudiendo ahora activar a linfocitos T autorreactivos circulantes (Aichele y col.,1996; McDevitt, 2000).

Otro caso sería el de las células B capaces de reconocer antígeno propio, cuando éste va ligado a una bacteria, y de ésta manera interactuarían con los linfocitos Th, produciéndose la respuesta inmune.

En algunas ocasiones, existe una gran semejanza estructural entre los antígenos microbianos y los autoantígenos, pudiendo producirse reacciones cruzadas que dañan los antígenos propios (Barnaba y Sinigaglia, 1997 ).

Por último, a causa de un traumatismo o de una infección, se pueden liberar autoantígenos secuestrados normalmente en sitios inmunológicamente privilegiados, desencadenándose un proceso autoinmune (Ferguson y Griffith, 1997)

En la actualidad no existen tratamientos específicos dirigidos a subsanar o evitar estos fallos en los procesos inmunológicos. Los fármacos disponibles intentan actuar globalmente sobre la respuesta inmune o sus efectos, como es el caso de los fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores. Por todo ello se trata de abordar la enfermedad desde el mayor número posible de dianas, de tal manera que con un amplio arsenal de fármacos que actúen a diferentes niveles, las dosis a administrar se reduzcan y se minimizen los efectos secundarios que conlleva el uso de la mayoría de ellos. En estos procesos sería de gran interés inhibir la proliferación de los linfocitos hasta unos niveles de inmunosupresión compatibles con un estado normal del individuo.

### **I.2.1.3. Proliferación celular y su relación con la IL- 2.**

Las células T maduras que abandonan el timo para circular por los órganos linfoides periféricos y que aún no se han puesto en contacto con un antígeno, se denominan células T “naïve”. Para participar en una respuesta inmunitaria adaptativa, estas células deben reconocer un antígeno presentado por una célula presentadora en el entorno del CMH. Además es necesaria la liberación de citocinas para que se inicie el proceso de proliferación.

Las células T “naïve” pueden permanecer muchos años sin dividirse. En reposo tienen la cromatina condensada, un citoplasma escaso y sintetizan niveles bajos de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Con la activación, entran en el ciclo celular y se dividen rápidamente para producir una progenie abundante que se diferenciará a células efectoras.

La citocina denominada IL-2, producida por las mismas células T activadas, dirige su proliferación y diferenciación (Schatz y Malissen, 2002). Cuando el linfocito se estimula, bien por la presencia de antígeno y señales coestimuladoras o *in vitro* en respuesta a mitógenos, entra en la fase G1 del ciclo celular y al mismo tiempo induce la síntesis de IL-2 y de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2. Este receptor consta de tres cadenas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), estando las dos últimas presentes en los linfocitos en reposo y mostrando una afinidad moderada por IL-2. Así, la célula en reposo respondería solo a altas concentraciones del ligando. La estimulación creada por IL-2 es autocrina, de tal manera que solo esta célula se ve afectada. Cuando la IL-2 se une al receptor de alta afinidad induce la progresión del ciclo celular pudiéndose dividir las células de esta manera dos o tres veces al día (Samelson, 2002).

Por todo lo expuesto, es esencial la intervención de IL-2 para que se inicie la respuesta inmune, por lo que muchos fármacos inmunosupresores ejercen su acción a nivel de la producción de esta citocina (Liu y col., 1991). A este nivel actúan fármacos inmunosupresores como ciclosporina o tacrolimus, que regulan, en última instancia, los niveles de producción de IL-2.

### **I.3 LOS DITERPENOS COMO AGENTES ANTITUMORALES E INMUNOMODULADORES.**

#### **I.3.1. DITERPENOS: BIODIVERSIDAD, ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN.**

La gran biodiversidad química que ofrecen los productos naturales obtenidos de plantas, organismos marinos o microorganismos ha sido utilizada por el ser humano durante cientos de años para combatir el dolor, producir placer y curar diversas enfermedades (Lam, 2007).

En la actualidad más del 60% de los fármacos comercializados proceden de productos naturales (Harvey, 2007; Harvey, 2008).

Además, las estructuras químicas de los productos naturales han constituido un punto de partida para el diseño y la síntesis de series de análogos con mayor actividad biológica y propiedades más favorables, en particular en la búsqueda de moléculas “cabezas de serie” frente a nuevas dianas terapéuticas (Harvey y col., 2010). Ello ha permitido el desarrollo de la Química Combinatoria con la obtención de librerías de compuestos, como por ejemplo aquellas basadas en algunos diterpenos antiinflamatorios



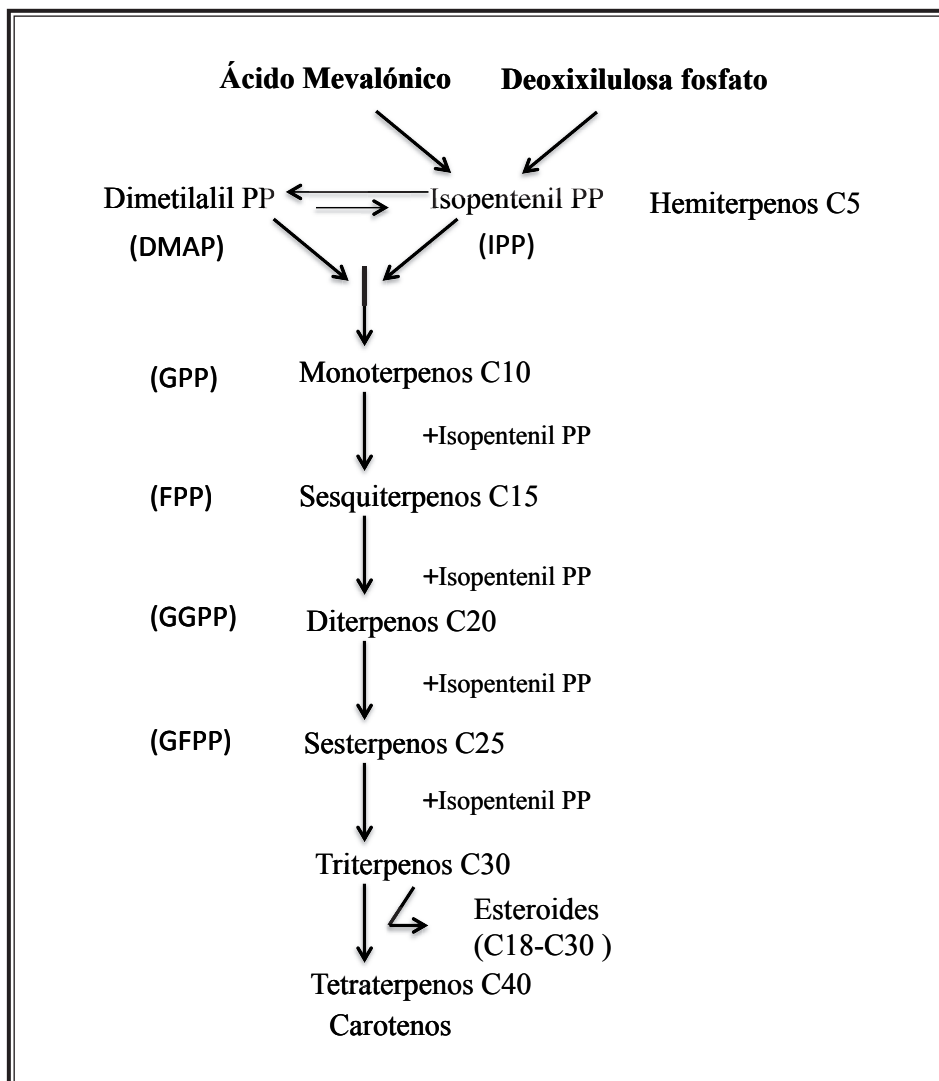
## Introducción

como el andrografólido (Mang y col., 2006). Estas librerías son compatibles con el uso de las técnicas modernas de screening (“Screening de alto rendimiento”) y la aplicación del conocimiento de dianas moleculares en la biosíntesis de compuestos.

Entre los distintos grupos de compuestos naturales, los terpenos constituyen un grupo químico de amplia distribución en la naturaleza al que se atribuyen propiedades biológicas diversas: antiviral, antiinflamatoria, antitumoral y antibacteriana, entre otras (Bonito y col., 2011; Chinou, 2005; de las Heras y col., 2003; de las Heras y Hortelano, 2009).

Desde un punto de vista evolutivo, todos los metabolitos secundarios biosintetizados poseen actividad biológica con efectos beneficiosos para el organismo que los produce. Tradicionalmente los terpenos intervienen en procesos de defensa frente al estrés ambiental, constituyendo un mecanismo de reparación de heridas y daños del organismo. Estos compuestos son metabolitos secundarios que derivan de dos vías biosintéticas en especies vegetales, la vía del ácido mevalónico y la vía de la deoxixilulosa fosfato (Eisenreich y col., 2004). Los distintos terpenos se forman por la adición sucesiva de unidades de isopentenil pirofosfato o isopreno activo (IPP), clasificándose en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos y carotenos, atendiendo al número de isoprenos presentes en su estructura, como se observa en Figura 12.

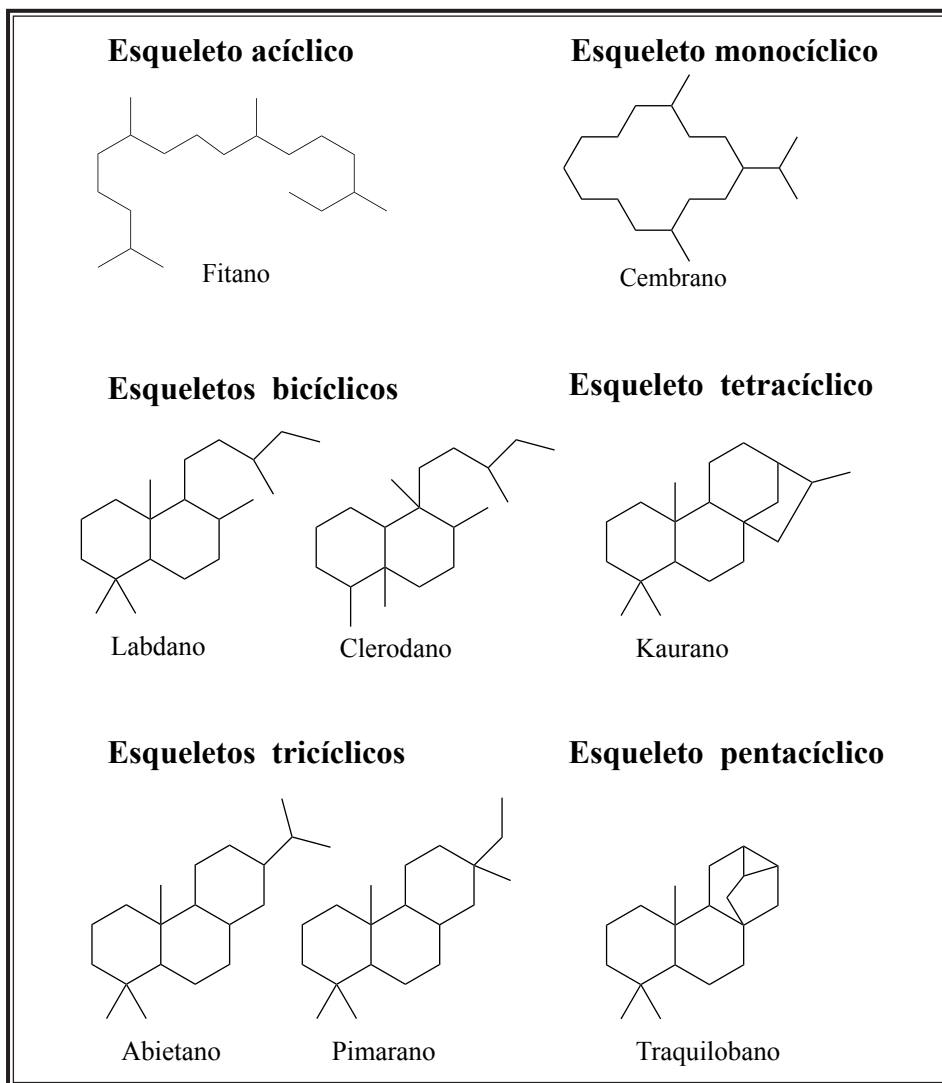
Los diterpenos derivan del geranilgeranil pirofosfato (GGPP) formado por cuatro unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). La clasificación de los distintos tipos de diterpenos esta basada en la estructura de su esqueleto pudiendo ser ésta acíclica o cíclica con uno o varios ciclos (Figura 13).



**Figura 12.- Formación de terpenos por adición de unidades de isopentenil pirofosfato (IPP).**

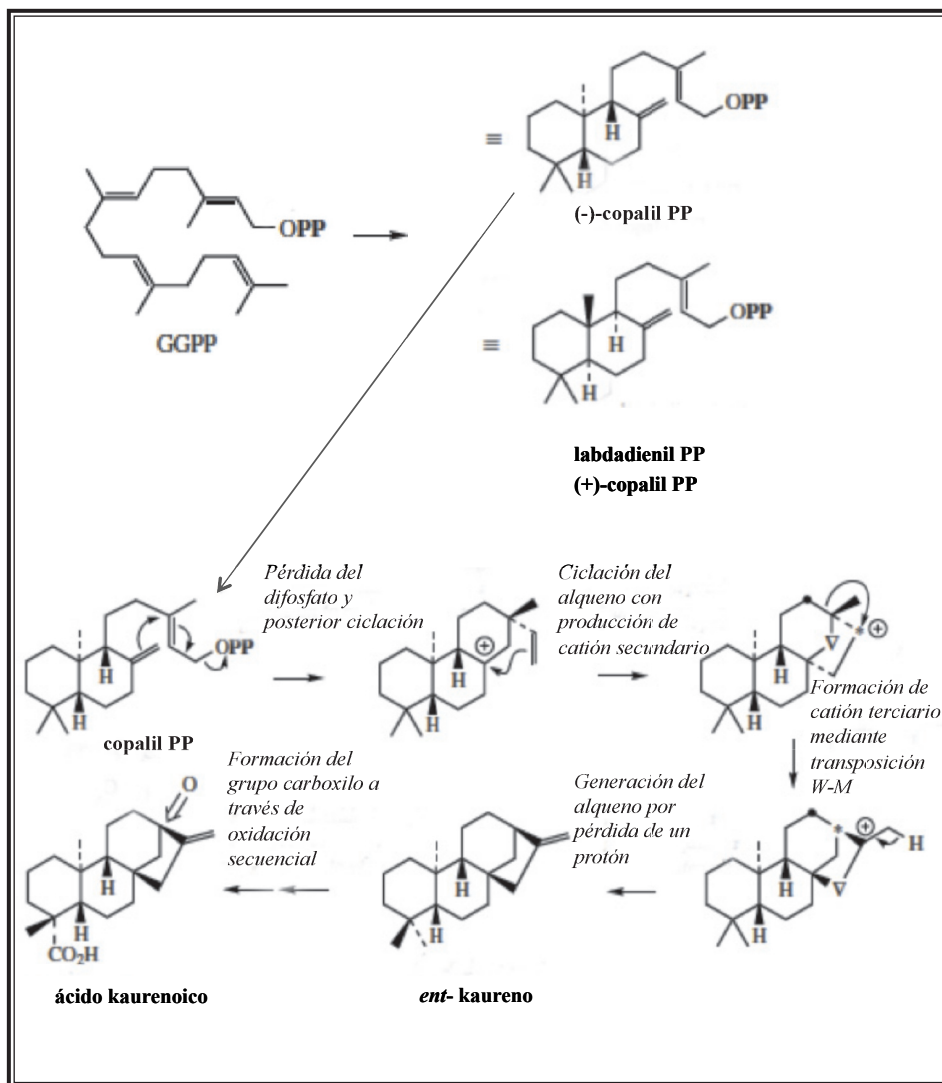
Los isómeros IPP y DMAP son las unidades isoprénicas que al unirse darán lugar a los monoterpenos y mediante la adición de nuevas unidades de IPP se formarán el resto de terpenos. DMAP: Dimetilalilpirofosfato, IPP: isopentenilpirofosfato, GPP: Geranilpirofosfato, FPP: Farnesilpirofosfato, GGPP: Geranilgeranilpirofosfato, GFPP: Geranilfarnesilpirofosfato.

## Introducción



**Figura 13.- Principales tipos de esqueletos presentes en diterpenos.**

Los diterpenos **tipo labdano y kaurano** derivan como el resto de diterpenos del GGPP (Dewick, 2006). Durante la síntesis de los diferentes diterpenos es frecuente encontrar compuestos con esqueletos pertenecientes a series enantioméricas, aunque nunca en la misma especie vegetal. Esto significa que existen enzimas con capacidades enantioméricas



**Figura 14.- Mecanismo propuesto para la formación de los diterpenos de tipo kaurano.**

Adaptado de Dewick (2006).

opuestas a la hora de plegar las cadenas poliolefínicas. Así se explica que partiendo de un precursor común, el GGPP, se obtengan dos enantiómeros que darán lugar a compuestos con propiedades diferentes. Según se observa en la Figura 14, dependiendo de que el enantiómero

## Introducción

sea (+)-copalil PP o (-)-copalil PP, obtendremos derivados de tipo labdano, abietano, pimarano o diterpenos de tipo *ent*-kaurenos.

En la última década, los diterpenos han sido objeto de amplios estudios debido a la variedad de actividades biológicas que presentan, particularmente en áreas como la inflamación, el cáncer o la autoinmunidad (Bonito y col., 2011; de las Heras y Hortelano, 2009; Lim y col., 2012; Salminen y col., 2008).

### 1.3.2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LOS DITERPENOS.

En el área del cáncer un ejemplo representativo es el diterpeno taxol (paclitaxel) o su derivado el docetaxel, con un amplio uso clínico como fármacos antitumorales. En este contexto, es interesante destacar el potencial citotóxico de algunos diterpenos publicados en la literatura, que se revisan a continuación.

#### 1.3.2.1. Diterpenos de tipo labdano.

Los **Diterpenos de tipo labdano** como Coronarin D, [E-labdano-8(17),12-diene-15-ol], aislado de *Hedychium coronarium* inhibe la activación de la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Factor nuclear  $\kappa$ B), produciendo un aumento de apoptosis, inhibición de la invasión y supresión de la osteoclastogénesis. Este diterpeno también inhibe la expresión de genes regulados por NF- $\kappa$ B implicados en la supervivencia celular, proliferación, invasión y angiogénesis (Kunnumakkara y col., 2008). Kumrit y col., (2010) describen la actividad citotóxica de siete diterpenos labdánicos: coronarina E, coronarina A, yunnancoronarina A, yunnancoronarina B, hedyforrestina B, villosina, y hedyforrestina C aislados del rizoma de *Hedychium gardnerianum*.

- El andrografólido es uno de los componentes mayoritarios de *Andrographis paniculata*, junto con el 14-deoxi-11,12-didehidro-andrografólido y el neoandrografólido. El andrografólido ha sido probablemente uno de los diterpenos labdánicos más estudiados, describiéndose su actividad antiinflamatoria y antitumoral tanto *in vitro* como en modelos experimentales de inflamación y cáncer en animales (Chao, 2010; Lim, 2012). Dada la potente actividad mostrada por este diterpeno, se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación biológica de librerías de análogos de andrografólido, mostrando algunos de ellos una actividad antitumoral superior al compuesto de partida andrografólido. Como mecanismos involucrados en su actividad antitumoral se incluye la inhibición de transductores de señales de tirosina cinasa tipo Janus, activadores de la transcripción, vías de señalización de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y NF- $\kappa$ B, supresión de la proteína de choque térmico (HSP90), ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas, metaloproteínas y factores de crecimiento, así como la inducción de proteínas supresoras de tumores como p53 y p21 (Pratheeshkumar y col., 2012) que conducen a la inhibición de los procesos de proliferación celular, supervivencia, metástasis y angiogénesis.
- El diterpeno esclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) mostró actividad citotóxica en tumores de mama (Dimas y col., 2006). Así mismo, induce apoptosis en células de cáncer de colon, inhibiendo el crecimiento del tumor *in vivo* mediante un mecanismo independiente del gen p53. El esclareol induce la muerte de células tumorales deteniendo el ciclo celular en la fase G1,

## Introducción

a la vez que produce apoptosis por activación de caspasas 8, 9 y 3 (Mahaira y col., 2011).

- Derivados del diterpeno labdánico hispanolona muestran actividad inductora de apoptosis en distintas líneas tumorales. El mecanismo de acción antitumoral implica activación de caspasa 8, con posterior participación de la vía mitocondrial, como se demuestra por la disminución del potencial de membrana mitocondrial, liberación de factores apoptóticos de la mitocondrial al citosol y activación de caspasas 9 y 3 (Traves y col., 2013). Estos compuestos también producen la fragmentación de la proteína Bid. Se ha sugerido que la vía de receptores de muerte desempeña un papel fundamental en la actividad proapoptótica de estos compuestos. La inhibición del crecimiento tumoral también se evidenció en modelos animales de inducción de tumores.
- Otros ejemplos de diterpenos labdánicos con actividad proapoptótica en distintas líneas celulares son el ácido pseudolárico que induce apoptosis mediante generación de ROS y degradación de Bcl-2 mediada por el proteosoma (Zhao y col., 2012) o el miriadenólido, aislado de *Alomia myriadenia* que produce despolarización de la membrana mitocondrial, induciendo apoptosis por activación de caspasas 8, 9 y 3 en células Jurkat E6 (leucemia linfocítica aguda humana) y THP-1 (línea de leucemia monocítica aguda) (Souza-Fagundes y col., 2003).

### 1.3.2.2. Diterpenos de tipo kaurano.

Probablemente han sido los **diterpenos de tipo kaurano** los más estudiados como agentes citotóxicos (Kondoh y col., 2004; Wang y col., 2011). La actividad citotóxica de estos compuestos en distintos tipos de células tumorales se ha relacionado con la inhibición que ejercen muchos de ellos sobre la actividad del factor NF- $\kappa$ B, como sucede en el caso del inflexinol (Ban y col., 2009).

- El diterpeno *ent*-kaurano Pharicina A aislado de especies vegetales del género *Isodon* detienen la progresión del ciclo celular en la fase de mitosis en células de leucemia humana y en tumores sólidos (Xu y col., 2010).
- Los diterpenos aislados del género *Rabdosia* también han mostrado propiedades antitumorales. Esta especie vegetal ha sido ampliamente usada en la Medicina tradicional china por sus propiedades antiinflamatorias, antitumorales y antibacterianas (Sartippour y col., 2005; Tan y col., 2011). Mecanismos como la inhibición del ciclo celular y/o inducción de muerte celular han sido implicados en los efectos antitumorales del diterpeno oridonina (Li y col., 2011). El tratamiento con oridonina de células de melanoma K1735M2 produjo la parada del ciclo celular en fase G2/M y en fase G1/S en células MCF-7 (cáncer de mama), actuando sobre distintas proteínas de ciclo celular como cdc2 y ciclina B. Además, oridonina induce apoptosis y autofagia en diversos tipos celulares tumorales (Liu y col., 2012). La autofagia no es únicamente un mecanismo de supervivencia, sino que paradójicamente también es una vía



## Introducción

de muerte celular en células cancerosas. En este contexto, oridonina induce autofagia mediante regulación negativa de la vía Ras/PI3K en células de cáncer de colon y células de cáncer de cérvix.

- El diterpeno kaurano aislado también del género *Rabdosia*, Glaucocalyxina A induce apoptosis en células leucémicas humanas mediante la generación de ROS a través de la vía mitocondrial (Gao y col., 2011).
- El ácido 19-kaurenoico presenta potencial citotóxico por daño en el ADN en células de leucemia promielocítica humana, intercalándose en el ADN celular (Cavalcanti y col., 2009).
- El triptolide aislado de *Tripterygium wilfordii*, no sólo es capaz de inducir apoptosis *per se* en células tumorales, sino que también aumenta la actividad apoptótica inducida por agentes citotóxicos como TNF- $\alpha$ , TRAIL y fármacos antitumorales como la gencitabina, independientemente del fenotipo p53, inhibiendo la activación de NF- $\kappa$ B (Zhou y col., 2012). También actúa incrementando la inhibición de la proteína antiapoptótica x-IAP, ejerciendo así su acción antitumoral (Huang y col., 2013).

### 1.3.2.3. Otros diterpenos con actividad antitumoral.

Otros ejemplos de diterpenos con efecto antitumoral son los **diterpenos de tipo abietano** entre ellos se encuentran las tanshinonas, diterpenos obtenidos de distintas especies vegetales del género *Salvia*. El potencial antitumoral de estos compuestos ha sido ampliamente demostrado en distintos tipos de células tumorales. Tanshinonas aisladas

de *Salvia miltiorrhiza*, son agentes capaces de inducir apoptosis y de inhibir la proliferación y la angiogénesis, habiéndose sugerido distintas dianas de actuación. Así, tanshinona I modifica la expresión de distintas ciclinas, induciendo apoptosis en distintos tipos de tumores (Gong y col., 2012).

Únicamente **diterpenos de tipo clerodano** aislados del género *Casearia* han sido evaluados como agentes citotóxicos (Dos Santos y col., 2010; Vieira-Junior y col., 2011). Se describe la casearlucina A, extraída de *C. membranacea*, que presenta una marcada actividad citotóxica en células de cancer de próstata humano (Shen y col., 2004).

### **1.3.3. ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LOS DITERPENOS.**

Los diterpenos no solo han sido objeto de estudio como agentes antitumorales, sino que también han sido evaluados como agentes inmunomoduladores. A continuación se describen una serie de compuestos de este grupo con acciones inmunosupresoras, que en muchos casos se trata de una acción añadida a la acción antitumoral de dichos compuestos.

- El andrografólido, diterpeno labdánico, ampliamente estudiado por sus propiedades antiinflamatorias y antitumorales, es así mismo capaz de reducir la producción de IL-2, en células Jurkat E6 estimuladas con ésteres de forbol/Ionomicina (PMA/IoM), disminuyendo los niveles de fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) como ERK1/2 (Carretta y col., 2009). Ejerce también una acción moduladora, tanto de la respuesta inmunológica innata como de la respuesta adaptativa a nivel de macrófagos y sobre la producción de anticuerpos (Wang y col., 2010b).

## Introducción

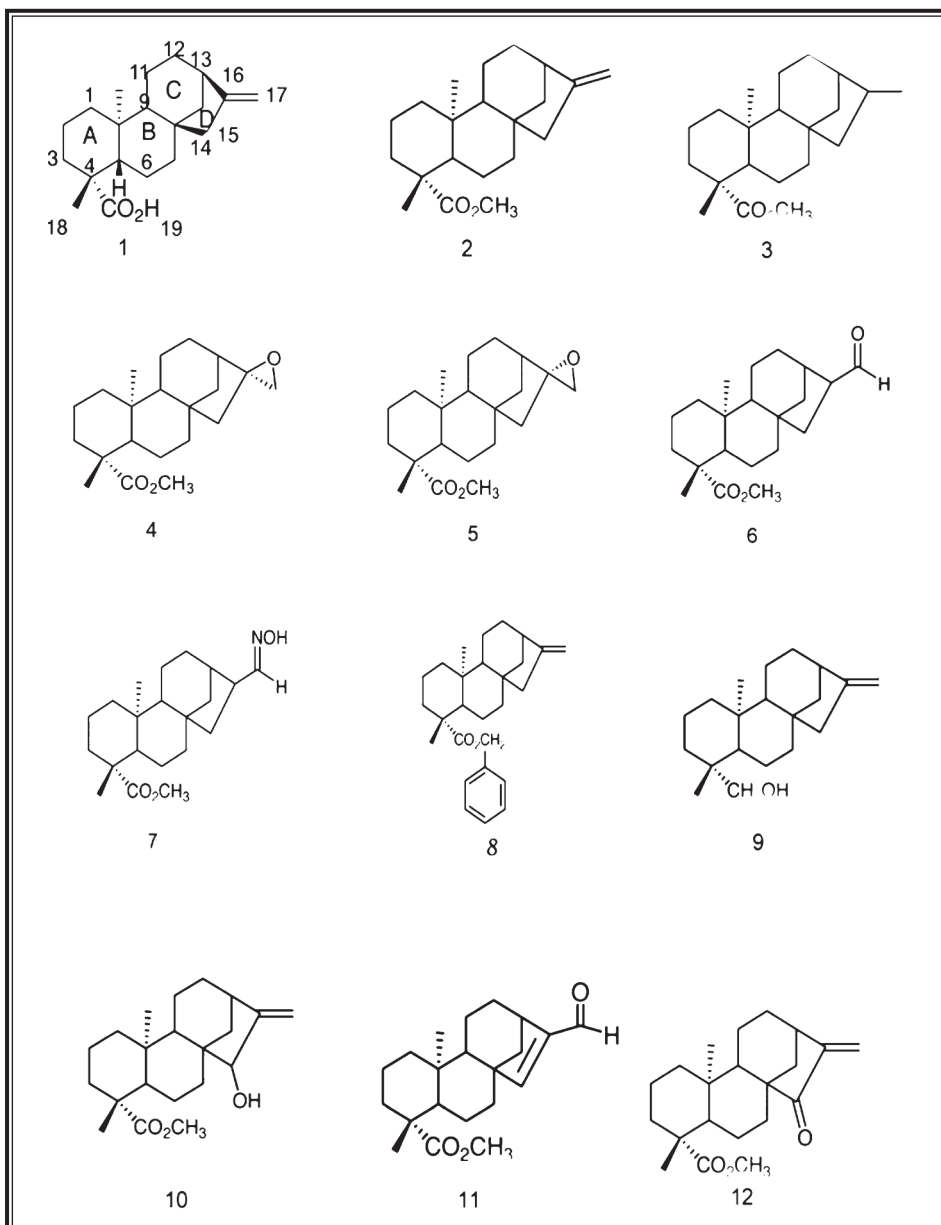
- El jatrofano es un diterpeno cíclico obtenido del género *Jatropha*, utilizado en la medicina tradicional en Asia, África y Latinoamérica en el tratamiento de distintas enfermedades. Así mismo se describe su actividad frente al virus VIH, disminuyendo la reactivación del agente causal, mediante la activación de la vía NF- $\kappa$ B (Bedoya y col., 2009; Sabandar y col., 2013).
- La oridonina aislada de distintas especies de *Rabdosia rubescens*, posee actividad antiproliferativa (Ikezoe y col., 2005). Estos compuestos son *ent*-kauranos que se encuentran también en *Isodon* Serra y está bien documentada su actividad inmunosupresora en linfocitos T, inhibiendo la proliferación celular a nivel de la replicación de ADN, deteniendo el ciclo celular en la transición de fases G1/S. (Liu y col., 2007)
- Otros *ent*-kauranos obtenidos del género *Isodon* como la wangzaozina y la kamebanina, están descritos en la bibliografía como agentes capaces de disminuir la proliferación celular a través de mecanismos ligados a la regulación del ciclo celular (Ding y col., 2005).
- La kamebakaurina es un diterpeno capaz de disminuir la producción de IL-2, e inhibir al factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Lee y col., 2002).
- El triptolide aislado de *Tripterygium wilfordii* disminuye la producción de IL-1 $\beta$ , suprimiendo así la activación de los linfocitos T (Jang y col., 2007). Recientemente también se ha descrito que este compuesto es capaz de inducir la diferenciación de células Th1 a Th2 (Yan y col., 2012). Un extracto de *T. wilfordii* se

comercializa en China para el tratamiento de enfermedades de origen autoinmune como la psoriasis o la artritis reumatoide, debido a sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores (Han y col., 2012).

#### I.4. DITERPENOS OBJETO DE ESTUDIO.

En esta Tesis Doctoral, se ha abordado el estudio farmacológico de una serie química de derivados kauranos semisintéticos (diterpenos **1-34**), sintetizados a partir de cuatro diterpenos de origen natural: ácido kaurenoico (**1**), ácido grandiflorénico (**16**), ácido 15- $\alpha$ -acetoxi-kaurenoico (**26**) y ácido 16- $\alpha$ -hidroxi-kaurenoico (**31**) como posibles agentes antitumorales e inmunomoduladores. Las Figuras 15a, 15b y 15c, muestran las estructuras químicas de los diterpenos estudiados. Las funcionalidades químicas presentes en estos cuatro diterpenos han permitido realizar transformaciones selectivas para obtener la presente serie de derivados kauránicos. Los diterpenos objeto de estudio fueron suministrados por la Dra. Ana Estévez-Braun del Instituto Universitario de Bio-Orgánica ‘Antonio González’, Universidad de La Laguna (Tenerife).

## Introducción



**Figura 15a.- Estructura química de la serie de diterpenos objeto de estudio.**

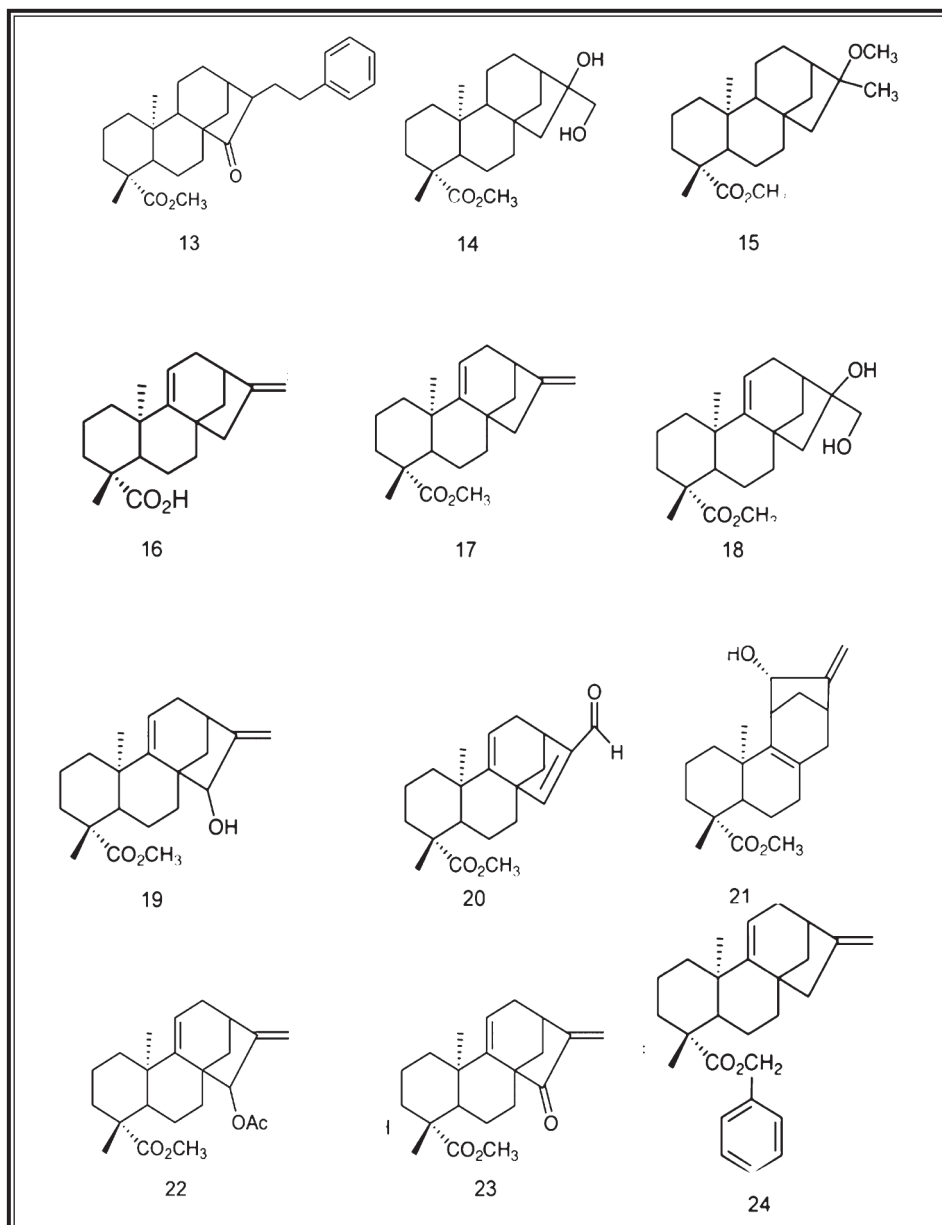


Figura 15b.- Estructura química de la serie de diterpenos objeto de estudio.

## Introducción

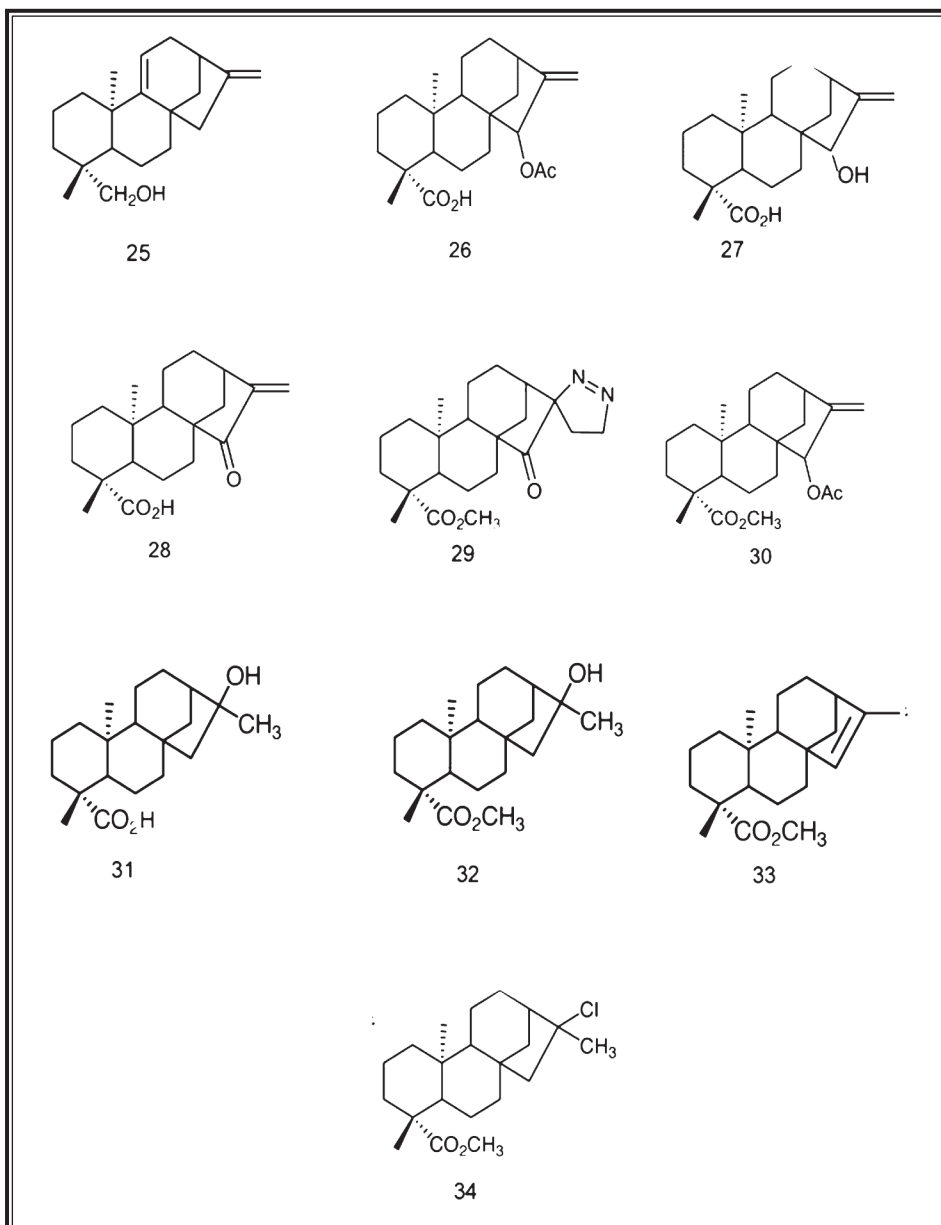


Figura 15c.- Estructura química de la serie de diterpenos objeto de estudio.



## OBJETIVOS

---







## II. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo experimental que constituye la presente Tesis Doctoral ha sido evaluar el potencial terapéutico de una serie de derivados diterpénicos, con el desarrollo de los siguientes objetivos concretos:

1. Análisis del potencial antitumoral de una serie química de 34 diterpenos de tipo kaurano, identificando grupos funcionales de relevancia en su actividad farmacológica.

2. Evaluación preliminar del potencial inmunomodulador de diterpenos kauranos, evaluando los mecanismos implicados en la proliferación y liberación de citocinas en linfocitos.





## MATERIAL Y MÉTODOS





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **III.1. COMPUESTOS OBJETO DE ESTUDIO.**

Las soluciones stock de los diterpenos objeto de estudio se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO), con diluciones posteriores en tampón fosfato salino (PBS).

#### **III.2. CULTIVOS CELULARES.**

##### **III.2.1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES.**

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratones machos de raza Swiss (25-30 g). Tres días antes de proceder a la extracción de los macrófagos se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal 2,5 mL de una solución de tioglicolato al 3% en agua destilada para estimular la producción de macrófagos. Tras este tiempo se sacrificó a los animales por inhalación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Se retiró la piel de la cavidad abdominal y se inyectaron 10 mL de medio RPMI 1640 (medio Instituto Roswell Park Memorial) frío a cada animal en dicha cavidad. Tras aplicar un suave masaje a la zona, se recuperó el medio con la jeringa y

## Material y Métodos

se centrifugó (800 g, 4 °C, 5 min.). El precipitado obtenido, constituido por macrófagos y linfocitos, se lavó dos veces con PBS, y finalmente se resuspendió en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS) y antibióticos [penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y gentamicina (40 µg/mL)]. Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos (10<sup>6</sup> células/mL) y se mantuvieron durante 2 horas a 37 °C. A continuación se retiró el medio y se lavaron los pocillos con PBS con el fin de eliminar las células no adheridas (linfocitos). Al menos doce horas antes de realizar los experimentos se sustituyó el medio por RPMI 1640 suplementado con 2 % de FBS.

### III.2.2 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES.

La línea celular de macrófagos murinos **RAW 264.7** y la línea celular **Jurkat E6** se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y L-arginina (1 mM). Las líneas celulares **HeLa** (cáncer de cérvix humano), **HT-29** (cáncer colorrectal humano) y **HepG2** (carcinoma hepático humano) se mantuvieron en cultivo en medio DMEM (medio Dulbecco modificado) suplementado con 10% de FBS, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y L-glutamina (2 mM). En todos los casos, las células se mantuvieron en el incubador a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Para la realización de los experimentos se utilizó el medio de cultivo correspondiente, reduciéndose la concentración de FBS al 2%.

### III.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.

Para evaluar la posible actividad citotóxica de los compuestos objeto de estudio sobre las líneas celulares se han utilizado dos ensayos: MTT (Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5,difeniltetrazolio) y XTT [(3),2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido)].

#### III.3.1. ENSAYO MTT.

La técnica se basa en la reducción del **MTT**, una sal de tetrazolio hidrosoluble, a formazán por la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas (Mosmann, 1983). El formazán es un compuesto púrpura insoluble en medio acuoso, por lo que la cantidad de formazán formada se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas.

Las células se preincubaron durante 20 horas con los compuestos objeto de estudio a las concentraciones indicadas (1-50  $\mu$ M) y se añadieron 120  $\mu$ L de una solución MTT (2 mg/mL). Tras un periodo de incubación de 1 hora a 37°C, se retiró el medio y el precipitado de formazán se solubilizó con 100  $\mu$ L de DMSO, determinándose la absorbancia a 550 nm, en un espectrofotómetro de placa (Digiscan mod. 6010152, Asys Hitech). Este ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo en distintas líneas celulares y en macrófagos peritoneales de ratón.



### III.3.2. ENSAYO XTT.

Para la determinación de la viabilidad celular en células Jurkat E6 se eligió el ensayo **XTT** (Scudiero y col., 1988). En este caso, se utiliza la sal de tetrazolio XTT y como catalizador el PMS (N-metilfenacina meto-sulfato). El XTT se reduce por acción de enzimas celulares formando una sal de formazán soluble coloreada.

Las células Jurkat E6 se sembraron a una densidad de  $10^6$  células/mL en placa de 96 pocillos, en medio RPMI sin rojo fenol suplementado con 10% de FBS y penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100  $\mu$ g/mL). Se utilizó medio RPMI sin rojo fenol a fin de evitar las interferencias con la sal soluble coloreada que se forma al añadir el XTT. Tras una preincubación con los diterpenos a concentraciones en el rango 5-50  $\mu$ M durante 20 horas, se agregaron a cada pocillo 50  $\mu$ L de una mezcla extemporánea de XTT (1 mg/mL) en medio sin suero y 0,025 mM de PMS en PBS estéril. Se incubó la placa durante 4 horas a 37 °C y posteriormente se llevó a cabo la lectura a 450 nm, en espectrofotómetro de placa (Digiscan mod. 6010152, Asys Hitech). En paralelo se determinó también la viabilidad celular en células pretratadas con los diterpenos durante 30 minutos y adición posterior de los estímulos PMA 50 ng/mL/IoM 750 ng/mL, procediéndose a continuación de forma similar.

### III.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

#### III.4.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES CITOSÓLICOS.

Las células RAW 264.7 se sembraron una densidad de  $10^6$  células/mL. Tras lavar posteriormente dos veces con tampón PBS, las células se resuspendieron en tampón A [Hepes 10 mM (pH 7,9), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, FNa 5 mM,  $\text{NaVO}_4$  1 mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  10 mM, PMSF 0,5 mM, leupeptina 10  $\mu\text{g/mL}$ , L pepstatina 1  $\mu\text{g/mL}$ , TLCK 4  $\mu\text{g/mL}$ ], dejando las muestras en hielo durante 15 minutos. Las células fueron lisadas con Nonidet P-40 (0,5 %) bajo agitación continua en vórtex durante 10 segundos. Finalmente, se centrifugaron las muestras (8000 g, 30 sg, 4°C) y se recogieron los sobrenadantes (**extractos citosólicos**).

#### III.4.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES TOTALES.

Tras los tratamientos correspondientes, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en tampón B [(Tris 10 mM (pH 7,5),  $\text{MgCl}_2$  1 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM)]. A continuación se añadió CHAPS (0,5 %), las muestras se centrifugaron (8000 g, 30 segundos, 4 °C) y se recogieron los sobrenadantes (**extracto total**).

### **III.4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.**

La concentración de proteínas en los extractos se determinó siguiendo el método descrito por Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina bovina sérica (BSA) como patrón. Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul de Coomassie (azul brillante), por fuerza iónica, con grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente.

### **III.4.4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.**

#### **III.4.4.1. Electroforesis y transferencia.**

Las proteínas se fraccionaron electroforéticamente en un gel SDS-poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para ello se tomaron 20 µg de extracto citosólico, se añadieron hasta 50 µL de tampón A y 12,5 µL de Tampón de muestra 5X [Tris-HCl 60 mM (pH 6,8), glicerol 25%, SDS 2 %, 2-mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%] y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos, según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970).

Los geles de poliácridamida se prepararon a diferentes porcentajes (8-15%) en función de la proteína a determinar. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (100 V) durante aproximadamente 85 minutos. Posteriormente las muestras fueron transferidas del gel de poliácridamida a una membrana Hybond™-PVDF en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 92 mM). El proceso se realizó a 350 mA durante 60 minutos.

**TABLA 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.**

<b>Ac primario</b>	<b>Ref.</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución</b>	<b>Ac secundario</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Dilución</b>
<b>p53</b>	sc-6243	SC	1/1000	sc-2004 anti-rabbit	SC	1/5000
<b>Bax</b>	sc-526	SC	1/500	sc-2004 anti-rabbit	SC	1/5000
<b>Bcl-2</b>	sc-783	SC	1/200	sc-2004 anti-rabbit	SC	1/5000
<b>Bcl-x</b>	sc-758	SC	1/100	sc-2004 anti-rabbit	SC	1/5000
<b>x-IAP</b>	610762	BD	1/5000	sc-2004 anti-rabbit	SC	1/5000
<b>β-actina</b>	A-5441	SA	1/5000	A9044 anti-mouse	SA	1/4000

**SC**= Santa Cruz Biotechnology. **SA**= Sigma Aldrich. **BD**= BD Transduction Laboratories

#### III.4.4.2. Inmunodetección.

Con el fin de saturar los sitios de unión inespecífica la membrana se mantuvo durante 1 hora en agitación en una solución de leche en polvo desnatada al 10% en PBS. Transcurrido ese tiempo, para llevar a cabo la identificación de las proteínas de interés, las membranas de PVDF fueron incubadas con los siguientes anticuerpos primarios específicos, según tabla 1. Posteriormente se lavó con PBS-Tween 20 0,2 % tres veces durante 10 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora. A continuación, se lavó la membrana de nuevo con PBS-Tween 20 tres veces durante 10 minutos.

La detección se realizó por ECL (quimioluminiscencia enzimática) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de las bandas se realizó por análisis densitométrico usando el programa informático Syngene. Se utilizó el anticuerpo  $\beta$ -actina para normalizar la carga de los geles.

### III.5. ANÁLISIS DE APOPTOSIS.

#### III.5.1. ANÁLISIS DE APOPTOSIS Y NECROSIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

El grado de apoptosis inducida por los diterpenos objeto de estudio se evaluó mediante citometría de flujo. Dicha técnica permite estudiar las características celulares a partir de una emisión de fluorescencia y de la dispersión de luz producida por células marcadas con moléculas fluorescentes (fluorocromos). El fluorocromo utilizado fue Ioduro de Propidio (IP), ya que se intercala en los ácidos nucleicos incrementando sensiblemente su fluorescencia. La membrana de las células vivas no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que sólo teñirá las células que tengan dañada su membrana.

El estudio del posible efecto apoptótico de los diterpenos se llevó a cabo en las líneas celulares RAW 264.7 y Jurkat E6.

Para la realización de este ensayo, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $10^5$  células/mL en macrófagos y de  $15 \times 10^4$  células/mL en Jurkat E6. Posteriormente se incubaron con

distintas concentraciones de los diterpenos (1-25  $\mu\text{M}$ ) durante 20 horas, en el caso de los macrófagos y con concentraciones (1-20  $\mu\text{M}$ ) en las células Jurkat E6. A continuación se retiró el sobrenadante de cada pocillo y se trasladó a tubos de citómetro. Después de lavar los pocillos con tampón PBS se añadió a cada pocillo 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla Tripsina-EDTA (0,05 %-0,53 mM) durante 2 minutos para despegar las células adheridas al fondo del pocillo. A continuación se recogieron las células y se centrifugaron junto con los sobrenadantes recogidos previamente (800 g, 5 min,  $t^a$  ambiente). En el caso de las células Jurkat E6 los sobrenadantes se centrifugaron directamente (800 g, 5 minutos,  $t^a$  ambiente). En ambas líneas celulares, el precipitado se tiñó con una solución de Ioduro de Propidio (IP) 0,005 % en PBS según protocolo descrito previamente (Hortelano y col., 2002). Se mantuvo en el incubador durante un periodo de 30 minutos y se determinó la emisión de fluorescencia del IP en un citómetro Cyan MLE-R (DAKO-Cytomation) con 3 longitudes de onda de excitación (488 nm, 635 nm y 365 nm). Se utilizó como control positivo de apoptosis las células sin tratamiento.

### III.5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS.

La actividad de las caspasas *in vitro* se midió en extractos totales de las células mediante un ensayo fluorimétrico basado en la hidrólisis de los sustratos selectivos de cada una de estas enzimas: Ac-DEVD-AMC (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído-7-amino-4-metilcumarina) en el caso de Caspasa 3 ( $\lambda_{\text{exc}}$ =360 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ =460), Ac-IETD-AFC (Acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-trifluorometilcumarina) para Caspasa 8 ( $\lambda_{\text{exc}}$ = 360 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ =528 nm) y Ac-LEHD-AFC (N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-7-amino-4-

## Material y Métodos

trifluorometilcumarina) para Caspasa 9 ( $\lambda_{exc}=360$  nm;  $\lambda_{em}=528$  nm), todos ellos suministrados por Calbiochem. Estos sustratos contienen secuencias específicas de aminoácidos susceptibles a la hidrólisis enzimática llevada a cabo por distintas caspasas. Los productos de la hidrólisis de estos sustratos son fluorescentes, y por tanto se puede relacionar la intensidad de fluorescencia con la actividad enzimática.

En este ensayo, las células se trataron 20 horas con los diterpenos (1-25  $\mu$ M), en presencia o en ausencia del inhibidor de caspasas Z-VAD (N-benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona) (40  $\mu$ M). Una vez finalizado el periodo de tratamiento, se obtuvieron los extractos totales según métodos descritos anteriormente.

El ensayo de la actividad de caspasas se llevó a cabo en placas de 96 pocillos. Se utilizaron 20  $\mu$ g de proteína obtenida del extracto total a los que se añadió tampón B, mencionado en el apartado III.4.2., hasta un volumen final de 50  $\mu$ L. A continuación se añadieron 50  $\mu$ L de una mezcla de sustrato específico para cada enzima y tampón B hasta obtener una concentración final de 20  $\mu$ M de sustrato en 100 mL de tampón. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. La medida se realizó por fluorescencia, utilizando un fluorímetro FL 800 Bio-Tek, a las longitudes de onda específicas para cada sustrato.

### III.6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.

El efecto de los diterpenos sobre la progresión del ciclo celular se realizó determinando el contenido en ADN (teñido con IP) mediante citometría de flujo.

Este ensayo puede ser utilizado para analizar la proliferación celular mediante la determinación de las fases del ciclo celular dentro de una población de células, proporcionando datos sobre el porcentaje de células en fase Go/G1 frente a las células en fase S.

Para poder establecer el efecto de los diterpenos sobre la progresión del ciclo celular, las células Jurkat E6 fueron sembradas en placa de 24 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo en medio RPMI sin suero. Tras 24 horas las células se preincubaron con los compuestos durante 30 minutos y se estimularon con una mezcla de PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL), incubándose a continuación durante 72 horas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Tras este período, se recogieron las células, se lavaron con PBS frío y se fijaron con etanol al 70 % durante 30 minutos a 4 °C. Después de un nuevo lavado con PBS frío, se tiñeron con una solución de IP 0,005 % en PBS, conteniendo 10 mg/mL de ribonucleasa A (ARNasa A). Se incubaron en cámara oscura, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. El contenido de ADN celular se analizó con un citómetro Cyan MLE-R (DAKO-Cytomation).



### III.7. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Con la entrada de las células en el ciclo celular, comienza la síntesis de ADN y la división celular. Durante la síntesis del ADN, nuevos nucleósidos van añadiéndose de manera complementaria a la hebra molde. Así la timidina se va uniendo a la adenina y la guanina a citosina. La detección de la cantidad de un determinado nucleósido que se añade a la hebra molde, nos dará una idea de la velocidad de formación del nuevo ADN y por lo tanto del nivel de proliferación.

El posible efecto antiproliferativo de los diterpenos se analizó mediante la incorporación de la bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina, a la cadena de ADN recién sintetizado de células en etapa de proliferación utilizando un kit comercial suministrado por Millipore. Tras la desnaturalización parcial de la doble cadena de ADN, la BrdU se detecta por métodos inmunoquímicos, permitiendo contabilizar las células cuyo ADN se ha sintetizado durante el ensayo.

El ensayo se realizó en células Jurkat E6, que se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de  $10^5$  células/mL, en medio RPMI sin suero durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó el medio mediante centrifugación a 280 g durante 6 minutos, y se añadió medio RPMI suplementado con FBS al 10%. Tras un pretratamiento de 30 minutos con los diterpenos objeto de estudio (5-50  $\mu$ M) se estimularon las células con una mezcla de PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL) y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. A continuación se añadió la BrdU, se incubaron

las células un periodo de 24 horas y se añadió la solución de fijación. Tras los lavados sucesivos con el buffer indicado y posterior secado, se procedió a la adición del anticuerpo monoclonal anti-BrU durante 1 hora. Tras sucesivos lavados, se incubó con un anticuerpo conjugado con peroxidasa durante 30 minutos y finalmente con sustrato para peroxidasa durante 30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo se añadió la solución de parada, determinándose la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placa (Digiscan mod. 6010152, Asys Hitech).

### III.8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-2.

Para determinar el efecto de los diterpenos sobre la producción de IL-2 por las células Jurkat E6, se sembraron en placa de 24 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI suplementado con 2 % FBS. Se pretrataron las células con los compuestos a concentraciones de 5, 10, 20 y 50  $\mu\text{M}$  y 30 minutos más tarde las células se estimularon con una mezcla de PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL). Se incubaron a 37 °C durante 20 horas, se centrifugaron (280 g, 6 minutos) y se retiraron los sobrenadantes. La determinación de la concentración de IL-2 se llevó a cabo en el sobrenadante mediante técnica ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante (Pierce).

### III.9. REACTIVOS.

- Los medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM, FBS (suero fetal bovino), tripsina y antibióticos (penicilina, estreptomicina y gentamicina) fueron suministrados por Life Technologies.
- El tioglicolato se adquirió en Difco.
- DMSO (dimetilsulfóxido), las sales  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , KCl, NaCl, FNa,  $\text{NaVO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) y EGTA (ácido etilen-glicol-tetra-acético), Tris (2-amino-2(hidroximetil)-1,3 propanodiol), se adquirieron en Panreac.
- El medio de cultivo RPMI sin rojo fenol, los aminoácidos L-arginina, glicina, y L-glutamina, reactivo XTT ([ (3), (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2H-tetrazol hidróxido)]), PMS (N-metilfenacina metosulfato), MTT (Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5,difeniltetrazolio), IP (Ioduro de Propidio), DTT (Ditiotreitol), PMSF (Fenil-metil-sulfonil fluoruro), las enzimas leupeptina y pepstatina, TLCK (N-tosil-L-lisina-clorometil cetona), Nonidet P-40 (octil-fenoxipolietoxi etanol), glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol, CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato), BSA (albúmina bovina sérica), SDS (dodecil sulfato sódico), 2-mercaptoetanol, PMA (éster de forbol), Ionomicina y los colorantes azul de Coomassie y

azul de bromofenol, fueron suministrados por Sigma Aldrich España.

- Las membranas Hybond™-PVDF (Polivinilpirrolidona), Tween 20 (polioxi-etilen-(20)sorbitan monolaurato) y ECL (potenciador de quimioluminiscencia), proceden de GE Healthcare Life Sciences.
- La RNasa A se adquirió en Roche.
- El kit de BrdU (bromodeoxiuridina) fue suministrado por Millipore.
- El Kit Elisa para detección de IL-2 procede de Pierce.

### III.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores presentados se han expresado como media  $\pm$  desviación estándar de la media (D.E.) de los resultados obtenidos en ensayos realizados por duplicado o triplicado de un número variable de experimentos que se especifica en cada caso.

Se utilizó el test de la “t” de Student para datos apareados o el análisis de la varianza (ANOVA). Se consideraron significativos las diferencias con  $p \leq 0,05$ .





## Resultados

---





## IV. RESULTADOS

### IV.1. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTITUMORAL DE LOS DITERPENOS.

#### IV.1.1. EFECTOS CITOTÓXICOS DE LOS DITERPENOS OBJETO DE ESTUDIO.

Para evaluar la posible citotoxicidad de la serie de diterpenos objeto de estudio (**1-34**), se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Para ello las células se trataron durante 20 horas con los compuestos indicados a concentraciones de 1-100  $\mu\text{M}$ .

En la Tabla 2 se muestran los valores de concentración inhibitoria 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) correspondientes a cada uno de los diterpenos evaluados en esta línea celular.

Como se puede observar, doce de estos compuestos presentaban un valor de  $\text{IC}_{50} \leq 25 \mu\text{M}$  (**8, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 21, 23, 26, 30 y 32**). Los compuestos más activos fueron el diterpeno **12** ( $\text{IC}_{50}$  1  $\mu\text{M}$ ) y los diterpenos **20, 21 y 23** con un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 5  $\mu\text{M}$ , por lo que fueron seleccionados para el posterior estudio de su actividad antitumoral.

A continuación se realizó una curva dosis-respuesta para evaluar la citotoxicidad de los compuestos seleccionados en el rango 1-25  $\mu\text{M}$  (Figura 16).

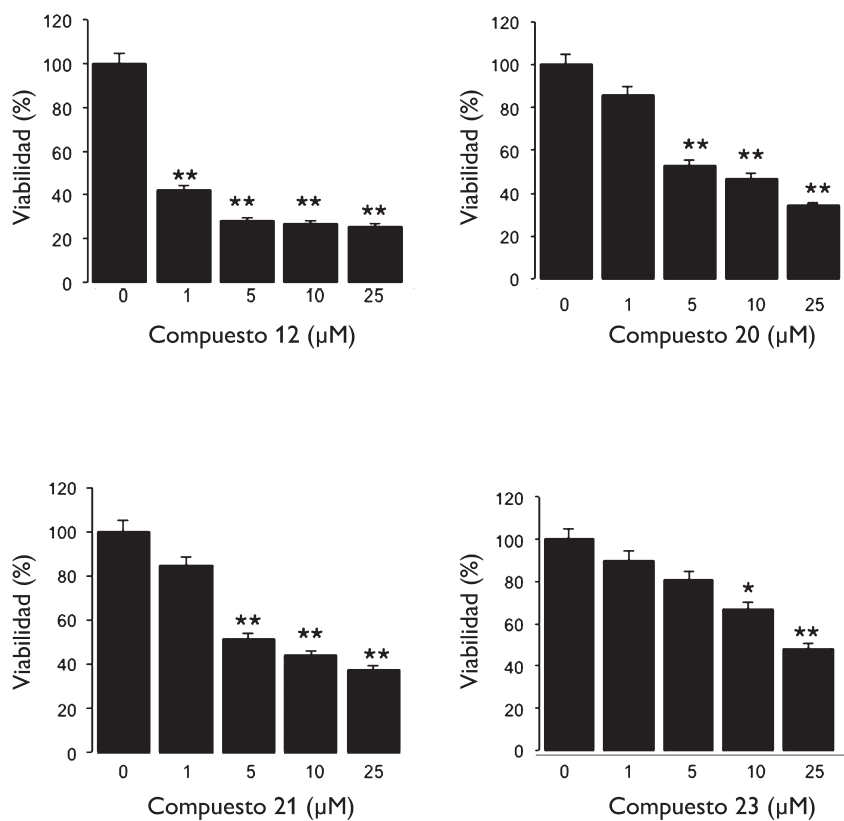


## Resultados

**TABLA 2. Efectos citotóxicos de los diterpenos objeto de estudio (1-34)**

Diterpenos	IC <sub>50</sub> (μM)	Diterpenos	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>1</b>	>100	<b>18</b>	25,0±3,7*
<b>2</b>	75,0±2,3	<b>19</b>	>100
<b>3</b>	75,0±2,6	<b>20</b>	5,0±0,4**
<b>4</b>	>100	<b>21</b>	5,0±0,3**
<b>5</b>	>100	<b>22</b>	35,0±3,6*
<b>6</b>	>100	<b>23</b>	5,0±0,7**
<b>7</b>	35,0±5,2*	<b>24</b>	65,0±2,0*
<b>8</b>	25,0±2,1*	<b>25</b>	35,0±1,5*
<b>9</b>	>100	<b>26</b>	25,0±0,3*
<b>10</b>	>100	<b>27</b>	>100
<b>11</b>	25,0±4,3*	<b>28</b>	35,0±1,9*
<b>12</b>	1,0±0,2***	<b>29</b>	100
<b>13</b>	>100	<b>30</b>	25,0±4,3*
<b>14</b>	10,0±0,5**	<b>31</b>	>100
<b>16</b>	15,0±1,3**	<b>33</b>	100
<b>17</b>	35,0±4,3*	<b>34</b>	>100

Los valores de IC<sub>50</sub> hacen referencia a la concentración de diterpeno necesaria para disminuir la viabilidad celular un 50%. Los resultados muestran la media ± D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001 respecto a las células no tratadas.



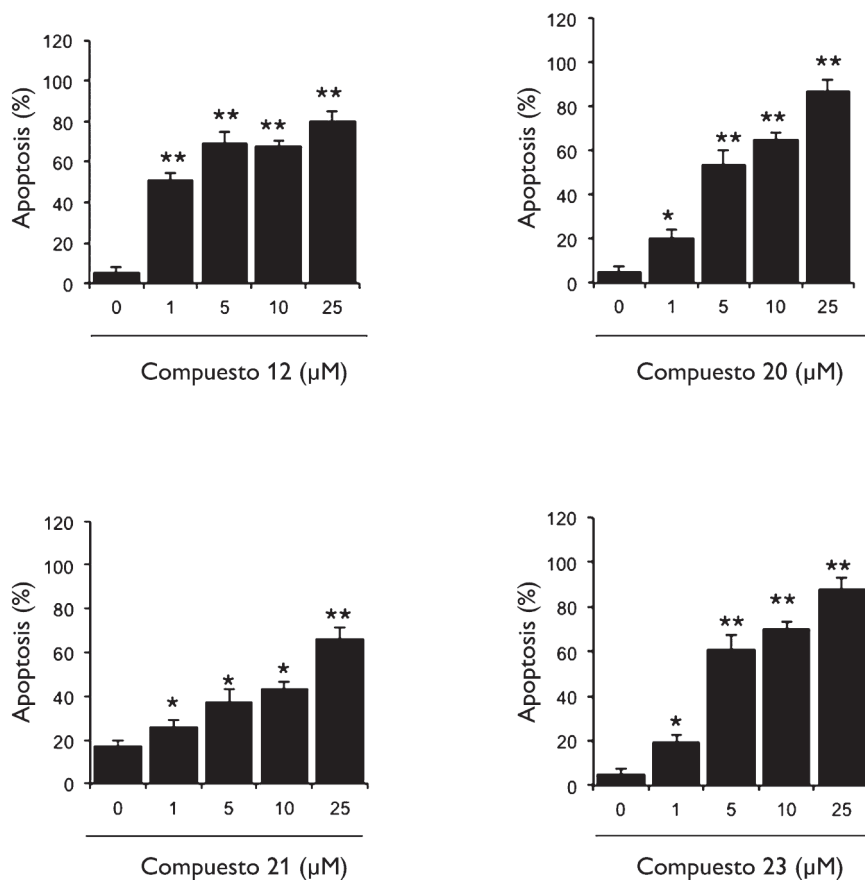
**Figura 16.- Efectos citotóxicos de los diterpenos 12, 20, 21 y 23.**

Las células RAW 264.7 fueron tratadas con los compuestos **12, 20, 21** y **23** (1-25  $\mu\text{M}$ ) durante 20 horas determinándose la viabilidad celular por ensayo de MTT. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  respecto a la condición control.

#### IV.1.2. ANÁLISIS DEL POTENCIAL PROAPOPTÓTICO DE LOS DITERPENOS 12, 20, 21 Y 23.

Uno de los mecanismos utilizados por las células tumorales en su crecimiento anómalo es la evasión del proceso de apoptosis, por lo que compuestos con actividad inductora de apoptosis pueden presentar un gran potencial como fármacos antitumorales.

Con el fin de investigar el potencial apoptótico de los cuatro diterpenos seleccionados **12, 20, 21, 23**, las células RAW 264.7 se incubaron con los diterpenos en un rango de concentraciones de 1-25  $\mu\text{M}$  durante 20 horas, analizándose el porcentaje de células apoptóticas mediante citometría de flujo (Figura 17). Los cuatro compuestos ensayados fueron capaces de inducir apoptosis, aunque los diterpenos **12** y **20** fueron los más activos con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



**Figura 17.- Inducción de apoptosis por los diterpenos 12, 20, 21 y 23.**

Células RAW 264.7 fueron incubadas con los diterpenos a las concentraciones indicadas durante 20 horas. El porcentaje de apoptosis se determinó mediante citometría de flujo tras tinción con IP. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E.. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  respecto a la condición control.

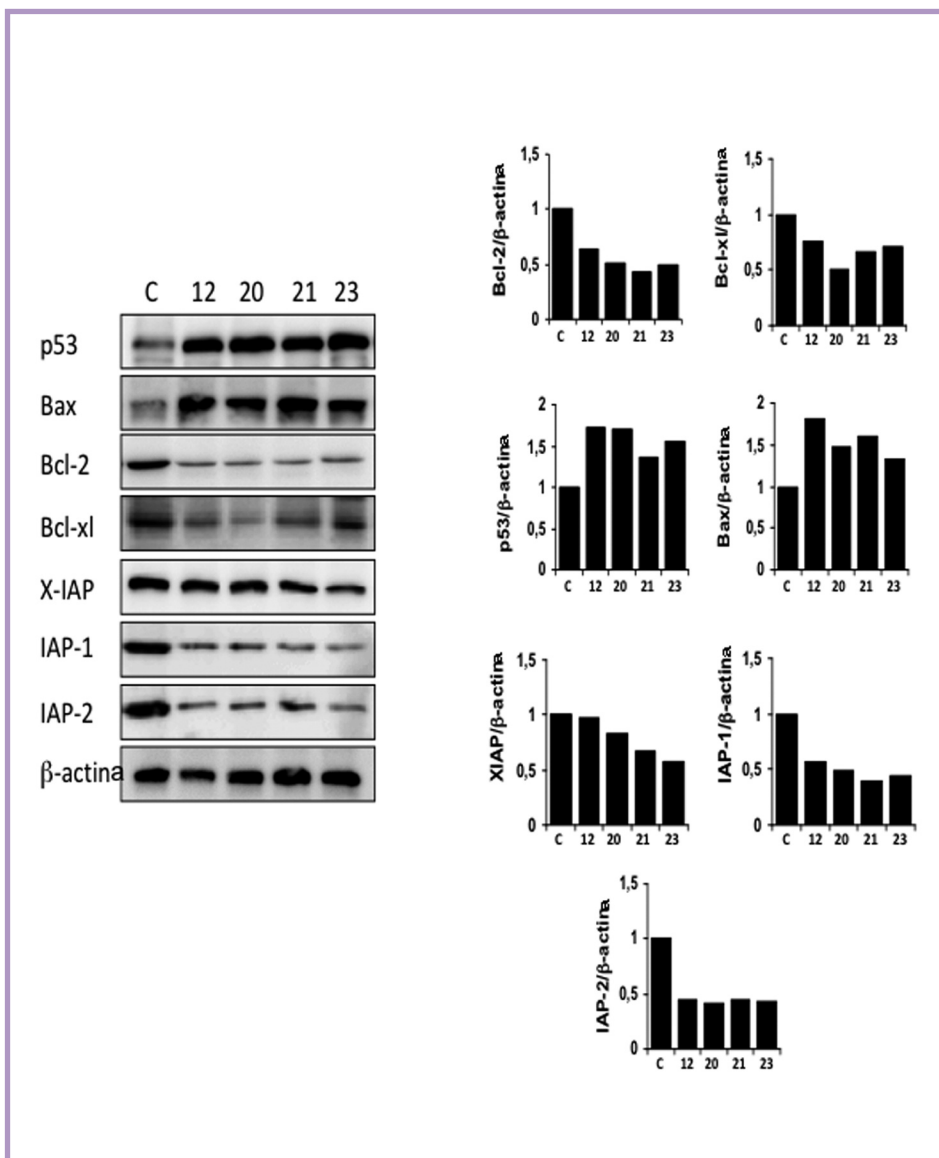
### **IV.1.3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DITERPENOS.**

#### **IV.1.3.1. Efectos de los diterpenos 12, 20, 21 y 23 en la expresión de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas.**

Con el fin de profundizar en la acción apoptótica de los diterpenos seleccionados, se procedió al análisis de la expresión de una serie de proteínas íntimamente ligadas al proceso de apoptosis.

Para ello, las células RAW 264.7 se incubaron con los compuestos **12, 20, 21 y 23** a la concentración de 5  $\mu$ M, analizándose mediante Western blot la expresión de proteínas proapoptóticas (p53, Bax), antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) o inhibidores de apoptosis como x-IAP, IAP-1 e IAP-2.

Como se aprecia en el Western blot de la Figura 18, los niveles de las proteínas apoptóticas p53 y Bax se elevaron con respecto al control de células no tratadas tras el tratamiento con los cuatro diterpenos. Por el contrario, los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL disminuyeron. Además, en el caso de las proteínas inhibidoras de apoptosis, se observó una clara disminución de IAP-1 e IAP-2, así como una disminución de los niveles de x-IAP, más marcado en el caso del compuesto **23**.



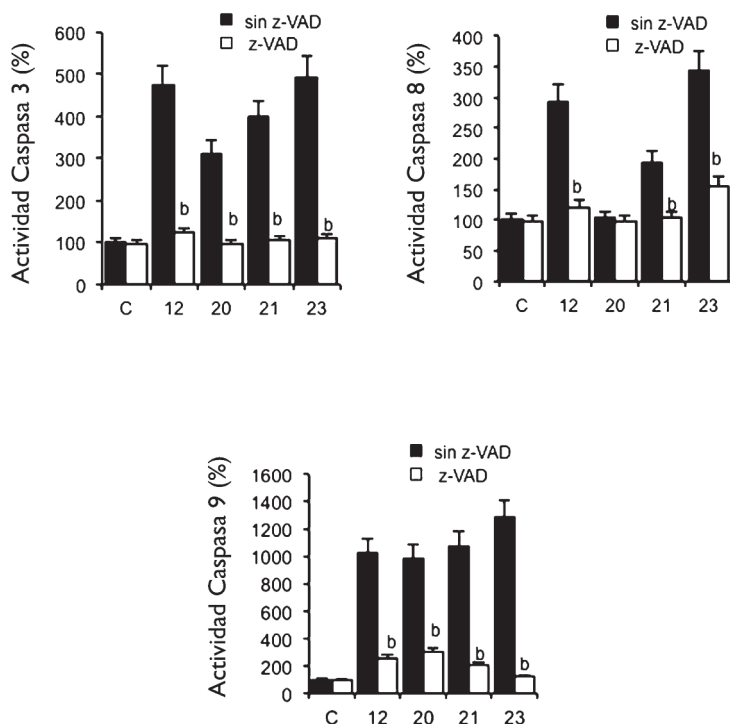
**Figura 18.- Efecto de los diterpenos 12, 20, 21 y 23 sobre la expresión de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas.**

Las células RAW 264.7 se incubaron con los diterpenos (5  $\mu$ M) durante 20 horas. La expresión de proteínas se determinó en extractos citosólicos mediante Western blot. Se utilizó  $\beta$ -actina como normalizador de carga. Se muestra un experimento representativo de tres. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría y se normalizó respecto a los niveles de  $\beta$ -actina.

#### IV.1.3.2. Los diterpenos **12**, **20**, **21** y **23** activan la vía de las caspasas.

Las caspasas son proteínas que desempeñan un papel clave en el proceso de apoptosis, siendo las principales ejecutoras del mismo.

El paso siguiente fue evaluar si los diterpenos inducen apoptosis mediante la activación de caspasas, y por tanto, determinar si las vías extrínseca y/o intrínseca de apoptosis estaban implicadas en la acción de estos compuestos. Se analizaron dos caspasas inductoras de apoptosis (caspasas 8 y 9) y una caspasa ejecutora del proceso (caspasa 3) mediante fluorimetría, utilizando los sustratos específicos de estas enzimas. Para ello se incubaron las células RAW 264.7 con los diterpenos **12**, **20**, **21** y **23** a una concentración de 5  $\mu$ M en presencia y ausencia del inhibidor de caspasas z-VAD (40  $\mu$ M). Como se observa en la Figura 19, los diterpenos **12** y **23** produjeron un aumento significativo de las caspasas 3 y 8, respecto al control de células sin tratar. El diterpeno **20** aumentó la actividad caspasa 3, pero no tuvo ningún efecto en la actividad de caspasa 8, mientras que los cuatro diterpenos fueron capaces de activar caspasa 9. Este efecto inductor de caspasas no se observó cuando las células fueron pretratadas con el inhibidor z-VAD.

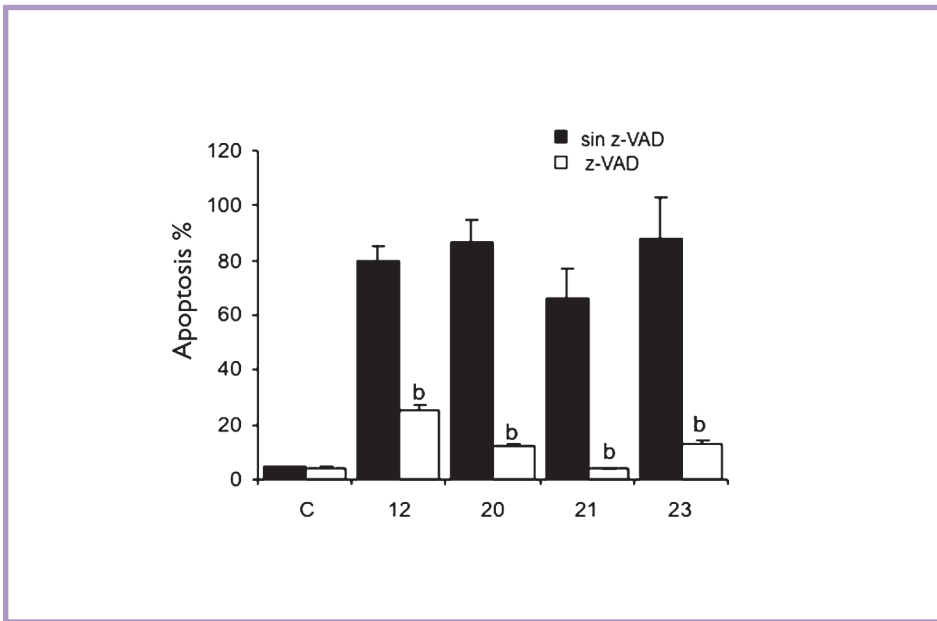


**Figura 19.- Activación de caspasas.**

La actividad de las caspasas se determinó mediante fluorimetría en extractos celulares tras tratamiento de las células RAW 264.7 con los compuestos **12**, **20**, **21** y **23** (5  $\mu$ M) en presencia y ausencia de z-VAD (40  $\mu$ M) durante 20 horas. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. b <0,01 con respecto a las células incubadas en ausencia de z-VAD.



## Resultados



**Figura 20.- Inducción de apoptosis por los diterpenos.**

Las células fueron tratadas con los compuestos (5  $\mu$ M) en presencia y ausencia de z-VAD (40  $\mu$ M) durante 20 horas y el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo tras tinción con IP. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. b <0,01 con respecto a las células incubadas en ausencia de z-VAD.

activación de las caspasas, evaluamos el porcentaje de apoptosis en células tratadas con los diterpenos en presencia y ausencia de z-VAD mediante citometría de flujo. Los cuatro diterpenos fueron capaces de inducir apoptosis, efecto que desaparecía en presencia del inhibidor z-VAD (Figura 20).

#### IV.1.4. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTITUMORAL DE LOS DITERPENOS EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS.

Los resultados obtenidos en la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 muestran la capacidad de los diterpenos como agentes inductores de apoptosis. El paso siguiente fue comprobar si estos diterpenos eran capaces de inducir apoptosis en líneas tumorales humanas con el fin de establecer su potencial antitumoral.

Para ello se trataron tres líneas celulares, Hela, HepG2 y HT-29, a concentraciones crecientes (1-100  $\mu\text{M}$ ) de los cuatro diterpenos, **12**, **20**, **21** y **23**, durante 20 horas, obteniéndose los valores de  $\text{IC}_{50}$  que se muestran en Tabla 3.

**TABLA 3. Efectos citotóxicos de los diterpenos 12, 20, 21, 23 en líneas tumorales humanas.**

Diterpenos	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	Hela	HepG2	HT-29
<b>12</b>	50,0 $\pm$ 6.3*	75,0 $\pm$ 8.3*	30,0 $\pm$ 2.7*
<b>20</b>	10,0 $\pm$ 1.4*	30,0 $\pm$ 3.3*	40,0 $\pm$ 4.5*
<b>21</b>	>100	>100	>100
<b>23</b>	30,0 $\pm$ 1.2*	>100	25,0 $\pm$ 2.7*

La viabilidad celular se expresó como valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ). Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

\* $P < 0,05$ , respecto a las células no tratadas.

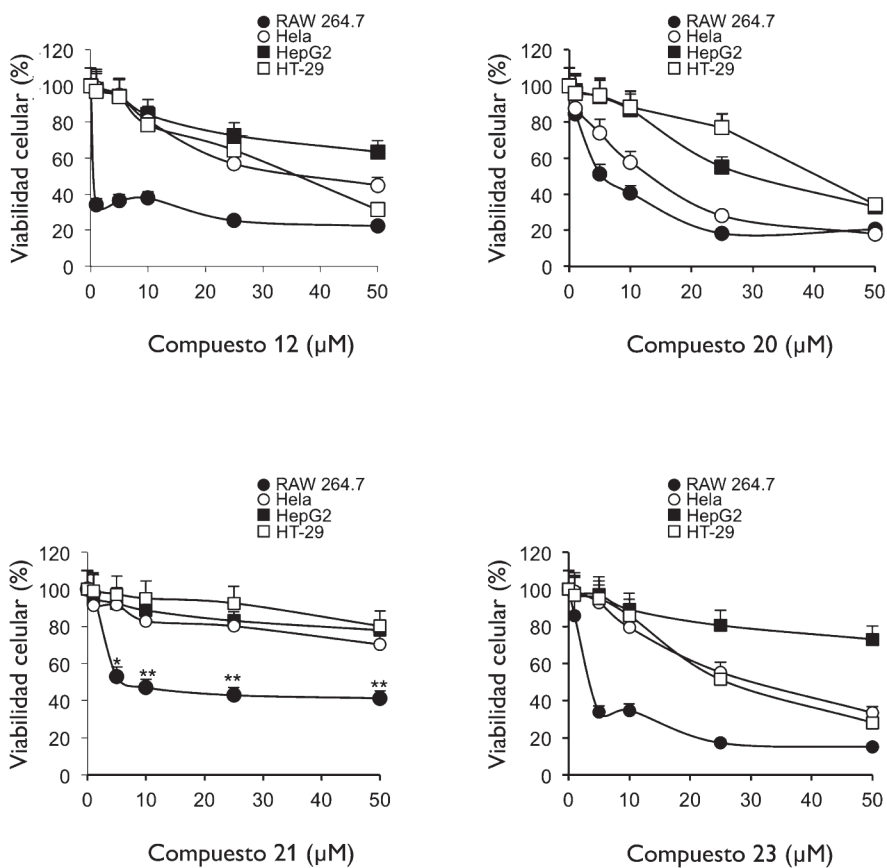
## Resultados

Como se aprecia en la Tabla 3, el diterpeno **21** no es citotóxico, ya que no disminuye la viabilidad celular en ninguna de las líneas celulares humanas ensayadas ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ).

A continuación, se analizaron los efectos dosis-respuesta de los diterpenos sobre las diferentes líneas celulares, observándose como todos los compuestos, salvo el **21**, fueron capaces de disminuir la viabilidad celular, siendo el compuesto **20** el que presentó actividad citotóxica dosis-dependiente con un efecto más pronunciado en células Hela (Figura 21).

Los datos obtenidos en los estudios de viabilidad celular indican que estos terpenos son firmes candidatos a agentes antitumorales, al disminuir la viabilidad de células tumorales humanas.

## Resultados

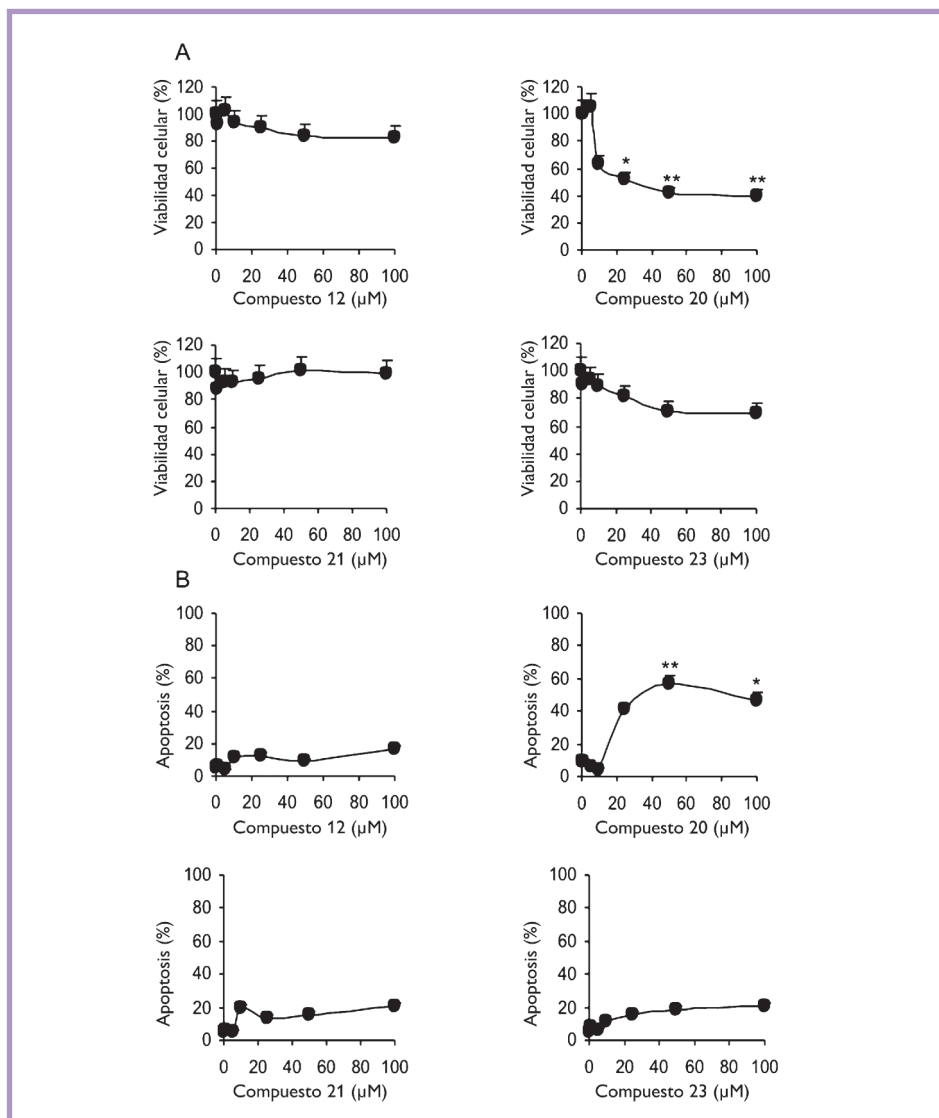


#### IV.1.5. EFECTOS CITOTÓXICOS DE LOS DITERPENOS EN CÉLULAS NO TUMORALES.

Uno de los problemas limitantes del tratamiento antitumoral es la toxicidad que presentan estos fármacos en células normales. Por tanto, es deseable que un fármaco antitumoral ejerza su acción en las células tumorales, afectando mínimamente a las células sanas.

Para examinar si los diterpenos activos **12**, **20**, **21** y **23** presentaban selectividad por las células tumorales, evaluamos sus efectos en células no tumorales (cultivos primarios de macrófagos peritoneales aislados de ratón). Los macrófagos peritoneales fueron tratados durante 20 horas con los compuestos en estudio, en el rango de concentraciones 0-100  $\mu$ M, determinándose tanto la viabilidad celular mediante MTT como la capacidad inductora de apoptosis que presentaban los compuestos en estas células no tumorales.

Como se observa en la Figura 22, el compuesto **20** fue el único que produjo una disminución significativa de la viabilidad celular, mostrando también actividad inductora de apoptosis en macrófagos peritoneales. El resto de los diterpenos no presentaban actividad citotóxica en estas células no tumorales. Estos datos ponen de manifiesto que las células tumorales son más susceptibles a la acción de estos diterpenos kauranos, pero son relativamente poco citotóxicos en células no transformadas, lo que sugiere un uso de estos compuestos como potenciales agentes antitumorales.



**Figura 22.- Efecto de los diterpenos sobre células no tumorales.**

A) Los macrófagos peritoneales murinos aislados de ratones inyectados con tioglicolato, se trataron con las concentraciones indicadas de los compuestos durante 20 horas. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT. B) Los macrófagos peritoneales se trataron con las concentraciones de los compuestos indicadas durante 20 horas. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo, tras tinción con IP. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes realizados por duplicado \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  respecto a la condición control.

## IV.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LOS DITERPENOS TIPO KAURANO

Una de las principales características de las enfermedades autoinmunes es el aumento de la proliferación linfocitaria. En esta segunda parte se analizaron los efectos de los cuatro diterpenos *ent*-kauranos (**12**, **20**, **21** y **23**) sobre la proliferación de los linfocitos T.

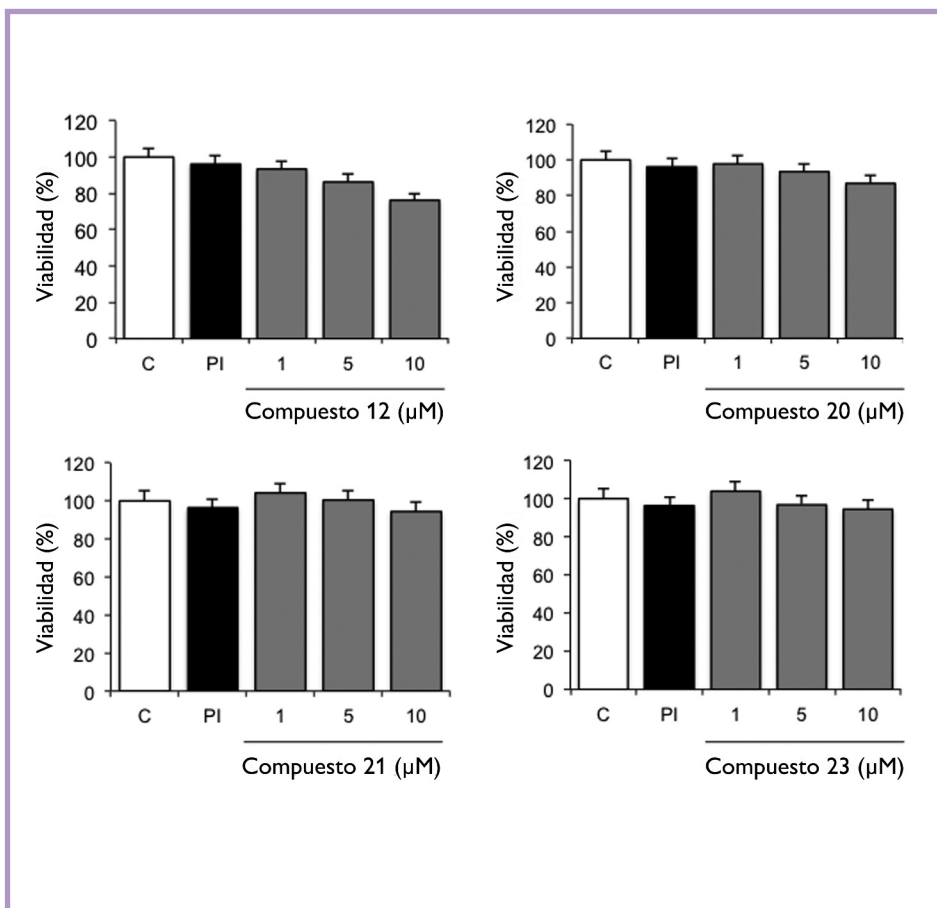
Uno de los mecanismos esenciales utilizados por el organismo para eliminar linfocitos T activos es la inducción de apoptosis. Así mismo, el descenso de los niveles de citocinas necesarias para su proliferación, como es el caso de IL-2 y la interrupción de la entrada de las células T quiescentes al ciclo celular o su detención en cualquier punto antes de la síntesis del ADN, provocará una falta de producción linfocitaria.

### IV.2.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS COMPUESTOS 12, 20, 21 Y 23 EN CÉLULAS JURKAT E6.

Como se ha establecido en el apartado anterior, el objetivo siguiente fue establecer la citotoxicidad de los compuestos sobre células directamente implicadas en la respuesta inmunológica, como son los linfocitos T, seleccionando para ello la línea celular de leucemia humana Jurkat E6. En estas células se determinó la viabilidad, mediante ensayo de XTT.

Para ello se sembraron las células a una densidad de  $10^6$  células/mL y se incubaron con los compuestos en presencia y ausencia de

## Resultados



**Figura 23.- Efectos citotóxicos de los diterpenos 12, 20, 21 y 23.**

Las células Jurkat E6 fueron pretratadas con los compuestos **12, 20, 21 y 23** (1-10  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos, añadiéndose posteriormente PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL). La determinación por XTT se realizó a las 20 horas. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. C= células control sin tratamiento, PI=PMA/IoM

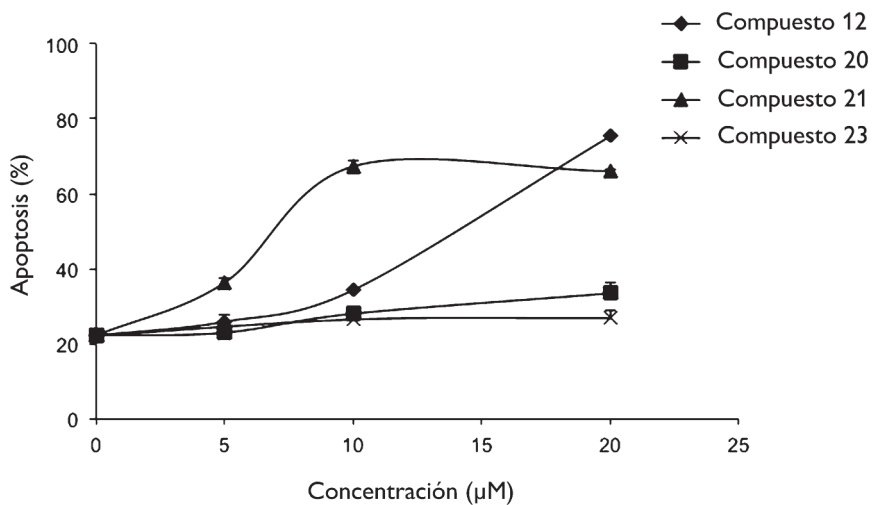
PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL), utilizados como mitógenos, durante 20 horas. La incubación de las células con los mitógenos no produjo cambios en la viabilidad celular, no observándose tampoco una disminución significativa de la viabilidad celular en presencia de los diterpenos (Figura 23).



#### **IV.2.2. LOS COMPUESTOS 20 Y 23 CARECEN DE TOXICIDAD SOBRE LAS CÉLULAS JURKAT E6.**

Para poder corroborar la actividad citotóxica de los compuestos en las células Jurkat E6, se evaluó el porcentaje de apoptosis mediante citometría de flujo. Dicho método pone de manifiesto el porcentaje de población celular que ha sufrido necrosis, apoptosis y el de células vivas con lo que los resultados presentan una alta fiabilidad. Para ello, las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/mL, incubándolas con concentraciones 1-20  $\mu\text{M}$  de los diterpenos durante 20 horas y analizándose posteriormente el porcentaje de células apoptóticas.

Como se aprecia en la Figura 24, los compuestos **12** y **21** indujeron apoptosis de forma dependiente de la dosis. Por el contrario, los compuestos **20** y **23** no presentaron actividad pro-apoptótica, por lo que se decidió continuar evaluándolos para ver si eran capaces de actuar a través de otros mecanismos implicados en la regulación de la proliferación de linfocitos T.



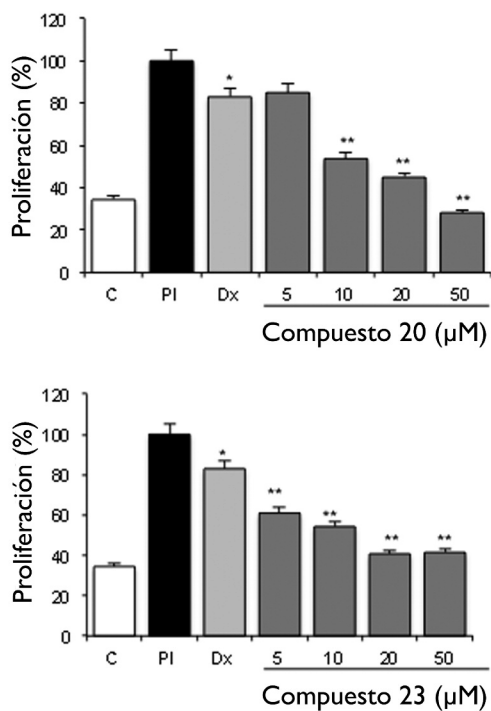
**Figura 24.- Efectos de los terpenos 12, 20, 21 y 23 sobre la viabilidad de las células Jurkat E6.**

Las células Jurkat fueron tratadas con los compuestos **12, 20, 21 y 23** a concentraciones 1-20  $\mu\text{M}$  durante 20 horas, analizándose la viabilidad celular por citometría de flujo. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

#### **IV.2.3. LOS COMPUESTOS 20 Y 23 DISMINUYEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÉLULAS JURKAT E6.**

Para establecer si los diterpenos seleccionados eran capaces de inhibir la proliferación celular de los linfocitos, se llevó a cabo un ensayo con BrdU, análogo estructural de la timidina, que se va incorporando durante la síntesis del ADN, llevándose a cabo su detección por métodos inmunoquímicos.

En la Figura 25 se aprecia como los compuestos **20 y 23** disminuyeron significativamente el aumento de proliferación inducido por la mezcla de mitógenos PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL.) en células Jurkat E6.



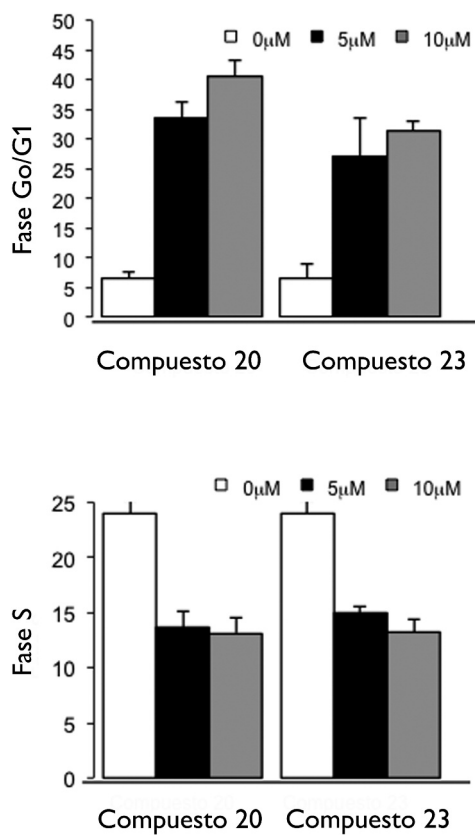
**Figura 25.- Efecto de los compuestos 20 y 23 sobre la proliferación celular linfocitaria.**

Tras sembrar las células Jurkat E6 en suero RPMI sin suero durante 24 horas, se preincubaron con los compuestos **20** y **23** (5-10 μM) o en ausencia de ellos como control negativo, durante 30 minutos, estimulándolas a continuación con PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL). Se utilizaron células preincubadas con dexametasona 10 μM como control positivo. Los resultados muestran la media ± D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  respecto a las células estimuladas PI. C=control, PI= PMA/IoM, Dx= Dexametasona.

#### **IV.2.4 . LOS COMPUESTOS 20 Y 23 INHIBEN LA DIVISIÓN DE LAS CÉLULAS JURKAT E6 Y DETIENEN EL CICLO CELULAR EN FASE G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.**

Una vez establecido el efecto antiproliferativo de los compuestos **20 y 23** en los linfocitos, el siguiente paso fue averiguar si dichos compuestos eran capaces de disminuir dicha proliferación deteniendo el ciclo celular y en qué fase del mismo.

Para ello se analizó el efecto que ejercían los compuestos **20 y 23** sobre la progresión del ciclo celular. Como se aprecia en la Figura 26, el compuesto **20** a las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$ , induce un aumento del 35 y 42% del número de células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, mientras que el compuesto 23 lo hace en un 28% y 32%, a las mismas concentraciones. Además, este aumento se corresponde con una disminución de las células en la fase S o fase de síntesis, indicando que los compuestos son capaces de detener la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.



**Figura 26.- Efecto de los compuestos 20 y 23 sobre la progresión del ciclo celular.**

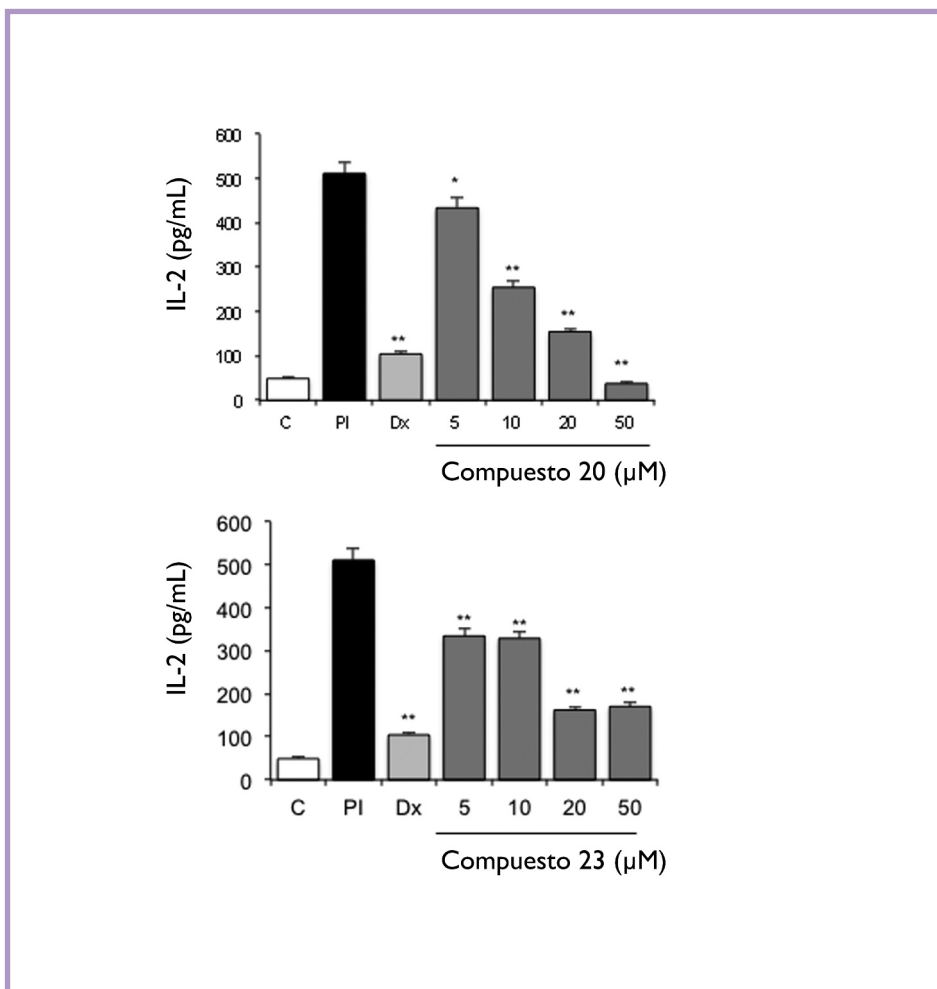
Se sembraron células Jurkat E6 en medio RPMI sin suero durante 24 horas. A continuación se pretrataron las células con los compuestos **20** y **23** (5-10  $\mu$ M) durante 30 minutos y se estimularon con PMA/IoM (50 ng/mL/750 ng/mL), durante 72 horas. Las células se trataron con ARNasa A, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados muestran la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

#### IV.2.5. LOS COMPUESTOS 20 Y 23 DISMINUYEN LA PRODUCCIÓN DE IL-2.

Finalmente en el estudio de la posible acción inmunomoduladora de los compuestos **20 y 23**, se llevó a cabo un ensayo destinado a evaluar la acción de los compuestos sobre una citocina con gran implicación en el proceso de proliferación linfocitaria, la IL-2.

Para ello se pretrataron las células Jurkat E6 con concentraciones en el rango de 5-50  $\mu\text{M}$  de los diterpenos, utilizando dexametasona como control positivo. Como se aprecia en la Figura 27, las células aumentaron la producción de IL-2 al ser estimuladas por mitógenos ( $511,03 \pm 42,43 \text{ pg/mL}$ ) con respecto a las células sin tratar ( $49,12 \pm 7,21 \text{ pg/mL}$ ), produciéndose una disminución dosis-dependiente y significativa en el caso del diterpeno **20** ( $\text{IC}_{50}=9,78$ ).

Como era de esperar en presencia de dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ), se produjo una disminución de los niveles de IL-2 del 78,5% , con respecto a las células estimuladas por mitógenos.









## Discusión

---





## V. DISCUSIÓN

Las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución mecanismos defensivos frente a patógenos, dando lugar a metabolitos secundarios capaces de comportarse como compuestos activos en una gran variedad de procesos biológicos. La búsqueda de nuevos medicamentos a partir de extractos de plantas ha llevado al descubrimiento de numerosos compuestos farmacológicamente activos con utilidad en el tratamiento de las enfermedades humanas.

En los últimos años, se ha producido un gran avance en el conocimiento de dianas moleculares que puede aplicarse a la búsqueda de nuevas herramientas para el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades humanas. En este sentido, la búsqueda de nuevas estructuras de origen natural y el diseño de modificaciones que aumenten la actividad terapéutica y disminuyan reacciones adversas, pudiendo servir como cabezas de serie, sigue constituyendo la base del desarrollo de nuevos productos con actividad farmacológica.

Los productos naturales han desempeñado un papel fundamental en el descubrimiento de nuevos fármacos, particularmente evidente en áreas como el cáncer donde el 60% de los fármacos utilizados, son de origen natural. A partir de 1960 e inspirado en la medicina popular, el Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute, NCI) de Estados Unidos, inició un programa de criba a gran escala para la búsqueda de agentes antitumorales. Entre los años 1960 a 1982, se evaluaron los efectos citotóxicos frente a líneas de leucemias de más de 35.000 plantas, extendiéndose posteriormente los análisis a un panel de 60 líneas tumorales humanas, que incluían tanto tumores sólidos como leucemias. Los resulta-

## Discusión

dos de estos análisis permitieron la identificación de agentes tan importantes como el paclitaxel (Taxol), obtenido del tejo del Pacífico *Taxus brevifolia*, que se utiliza para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón, ovario, mama y formas avanzadas del sarcoma de Kaposi (Mann, 2002)

A día de hoy, la evaluación de los productos de origen natural sigue constituyendo una de las principales áreas de investigación con el objetivo de encontrar nuevos fármacos que puedan ser utilizados en patologías tan diversas como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico o las patologías que se engloban bajo la denominación de enfermedades crónicas, cuyos pacientes deben de disponer de una amplia batería de fármacos para poder reducir la dosis diaria y minimizar los daños secundarios debidos a la medicación. Así mismo, tecnologías en auge como los trasplantes necesitan nuevos fármacos para minimizar los efectos de rechazo por parte del receptor. Este es el caso de los inmunosupresores, utilizados tanto en estas técnicas como en las enfermedades autoinmunes.

Dentro de los productos naturales, los terpenos son un grupo químico de amplia distribución en la naturaleza a los que se les han atribuido actividades biológicas diversas: antiinflamatoria, antiviral, antiproliferativa e inmunosupresoras, entre otras (Chinou, 2005; Cuadrado y col., 2012; de las Heras y col., 2003; de las Heras y Hortelano, 2009). En concreto, los diterpenos, compuestos identificados en numerosas plantas medicinales utilizadas en la Medicina tradicional, han despertado un gran interés en los últimos años por su potencial farmacológico. Sin olvidar, el ya mencionado Taxol, terpenos de tipo labdano, kaurano, clerodano, pimarano, lactonas sesquiterpénicas o monoterpenos cíclicos destacan por sus propiedades antitumorales y/o inmunosupresoras. (Jang y col., 2007; Lee y

col., 2002; Liu y col., 2005; Newman y col., 2003;). Así por ejemplo, ent-kauranos obtenidos de *Isodon serra*, *Espeletia schultii* o *Rabdosia rubescens* (Ruiz y col., 2008; Sartippour y col., 2005; Zhang y col., 2005;) han sido descritos como agentes antitumorales e inmunosupresores.

A lo largo de este proyecto de Tesis Doctoral, se han analizado los efectos de varios diterpenos de tipo kaurano, como potenciales agentes antitumorales y/o inmunosupresores, además de intentar establecer una relación entre la estructura química y su actividad farmacológica.

## V.1. EL FENÓMENO DE APOPTOSIS Y SU IMPLICACIÓN EN ENFERMEDADES TUMORALES.

En los últimos años, ha aumentado ostensiblemente el interés por la apoptosis, como proceso íntimamente ligado a numerosas patologías entre las que se incluyen el cáncer. Así, la inhibición del proceso de apoptosis a través de diversos mecanismos, conduce a una proliferación incontrolada de las células tumorales, pudiendo alterar tanto el inicio del tumor, su progresión y la aparición de metástasis. Es por ello, que un fármaco capaz de actuar a estos niveles sería un buen candidato en el tratamiento de estas patologías.

En el estudio de un nuevo fármaco como potencial regulador de los procesos de apoptosis es primordial establecer su grado de citotoxicidad. En nuestro caso, 12 de los 34 compuestos analizados mostraron

## Discusión

efectos citotóxicos en las células RAW 264.7 y 4 de ellos, los diterpenos **12**, **20**, **21** y **23**, presentaron una  $IC_{50}$ , con valores entre 1 y 5  $\mu M$ , lo que los hizo candidatos a un estudio más extenso siendo seleccionados para los siguientes ensayos. Un estudio más detallado de los efectos citotóxicos de estos *ent*-kauranos mediante ensayos dosis-respuesta, demostró que todos los compuestos eran capaces de afectar a la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis. El compuesto **12** fue el que indujo un mayor descenso en la viabilidad celular, 55% a una dosis de 1  $\mu M$  y 70% a 25  $\mu M$ , mientras que los compuestos **20**, **21** y **23** disminuyeron la viabilidad en un 55%, (**20** y **21**) y un 35% (**23**), a concentraciones de 10  $\mu M$ .

Puesto que el análisis de la citotoxicidad de los compuestos se llevó a cabo mediante el ensayo de MTT, que mide la funcionabilidad mitocondrial, decidimos estudiar el potencial proapoptótico de nuestros compuestos mediante citometría de flujo tras tinción con ioduro de propidio. De esta manera pudimos evaluar el porcentaje de células vivas, apoptóticas y necróticas. Tras incubación de las células RAW 264.7 con los compuestos seleccionados y posterior análisis, comprobamos que todos ellos fueron capaces de inducir apoptosis presentando de nuevo el compuesto **12** la mayor actividad con valores de  $IC_{50}$  de 1  $\mu M$ . Cabe destacar que estos valores se encuentran dentro de un rango conveniente para su estudio farmacológico.

Durante el proceso de apoptosis tiene lugar la activación de dos vías de señalización, la vía extrínseca o de los receptores de membrana y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas vías conducen a la activación de las caspasas, una familia de enzimas que actúan como moléculas efectoras en varios tipos de muerte celular. La vía extrínseca se inicia por unión de un ligando con su receptor transmembrana (FAS, TNFR, TRAIL, etc) para activar

a las caspasas iniciadoras (caspasa-8), que a su vez, activan por proteólisis a las caspasas ejecutoras o efectoras, tales como las caspasas-3 y -7. La vía intrínseca, requiere la disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales tales como el citocromo c. El citocromo c funciona uniéndose a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) para inducir la activación de la caspasa-9 y con ello la cascada de las caspasas. La permeabilización de la membrana mitocondrial se regula por las acciones opuestas de los miembros de la familia Bcl-2. Así pues, existen numerosos puntos de intervención en el proceso de apoptosis que pueden ser regulados con el fin de inducir efectos antitumorales.

Para comprobar si los compuestos objeto de estudio eran capaces de regular alguna de las vías implicadas en la señalización apoptótica, evaluamos la acción de nuestros cuatro compuestos sobre diversos miembros de la familia de Bcl-2. El análisis mediante técnicas de Western blot de la proteína pro-apoptótica Bax, así como de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL demostró que todos los compuestos aumentaban los niveles de la proteína Bax con respecto a las células no tratadas, mientras que disminuían los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, siendo en el caso de ésta última el efecto producido por el compuesto **20** más acusado que en el resto de los compuestos testados. Cabe destacar, que los compuestos no solo fueron capaces de aumentar Bax, si no que también disminuyeron los niveles de Bcl-2, estableciendo un ratio Bax/Bcl-2 favorable a la inducción de apoptosis. Este hecho es de enorme importancia ya que numerosos datos en la literatura indican que la susceptibilidad a la apoptosis no solo viene marcada por el aumento de los miembros apoptóticos de la familia de Bcl-2 y/o la disminución de los miembros anti-apoptóticos si no que el ratio Bax/Bcl2 actúa como un determinante mucho más importante en la susceptibilidad a la apoptosis.



## Discusión

Así, otros kauranos aislados de diferentes especies de *Rabdosia* como Glaucocalixina A u oridonin, inducen apoptosis en distintas líneas tumorales con ratios elevados de Bax/Bcl-2 (Gao y col., 2011; Qi y col., 2012).

Las caspasas son los efectores finales tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca de la apoptosis. Desde un punto de vista funcional, las caspasas se han clasificado habitualmente en caspasas iniciadoras como las caspasas 8 y 9 y en caspasas ejecutoras como la caspasa 3. La caspasa 8 es un componente de la vía extrínseca, mientras que la caspasa 9 pertenece a la vía intrínseca o mitocondrial, siendo la caspasa 3 un componente de la vía efectora, común a las dos anteriores.

Evaluamos la capacidad de los compuestos seleccionados para producir apoptosis mediante la activación de las caspasas, y por lo tanto, determinar si la vía extrínseca y/o intrínseca estaba implicada en el proceso. Todos los compuestos fueron capaces de activar a la caspasa 3, confirmando los resultados previos que habíamos obtenido en relación con la inducción de apoptosis. Este hecho fue además corroborado por la inhibición de la apoptosis y la ausencia de activación de las caspasas cuando las células fueron incubadas en presencia de los compuestos y un inhibidor general de caspasas como es el z-VAD. En relación a las caspasas ejecutoras 8 y 9, los cuatro diterpenos fueron capaces de activar caspasa 9, mientras que la caspasa 8 solo fue activada por los compuestos **12, 21 y 23**, no mostrando ningún cambio en presencia del compuesto **20**. Estos datos indicaban claramente que todos los compuestos eran capaces de inducir la vía de señalización mitocondrial, y que solo los compuestos **12, 21 y 23** activaban también la vía de señalización de los receptores.

Nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos para

otros derivados de *ent*-kauranos como la ponidina o la oridonina, para los que se ha descrito la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en diferentes líneas celulares incluyendo células de cáncer de pulmón, de osteosarcoma, etc (Jin y col., 2007; Liu y col., 2006). Los resultados obtenidos por nuestro grupo no nos permiten establecer si la activación de la vía mitocondrial por parte de los compuestos **12**, **21** y **23** es directa o viene mediada por la activación de la vía de los receptores, sin embargo en base a las evidencias que existen con respecto a otros *ent*-kauranos antes mencionados, como la ponidina o la oridonina, en los que la activación mitocondrial depende de la vía de los receptores podemos especular que en nuestro caso se produzca una situación similar.

Uno de los reguladores negativos más importantes de la apoptosis lo constituye la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Esta familia está formada por tres miembros, IAP-1 y IAP-2 (celular IAPs) y x-IAP que actúan regulando las dos vías de señalización apoptóticas, extrínseca e intrínseca a través de la inhibición directa o indirecta de la actividad de las caspasas (Deveraux y Reed, 1999). Así, IAP-1 y IAP-2 son inhibidores indirectos de la actividad caspasa, mientras que x-IAP se une directamente a las caspasas ejecutoras 3 y 7, y a la caspasa 9 iniciadora (Srinivasula y col., 1998). Puesto que las caspasas 3 y 7 desempeñan un papel clave en la ejecución de la apoptosis tanto en la vía extrínseca como intrínseca, y la caspasa 9 es esencial en la iniciación de la vía intrínseca, x-IAP es capaz de inhibir eficazmente ambas vías. Cuando analizamos los efectos de nuestros compuestos sobre las proteínas inhibidoras IAPs, observamos que los cuatro compuestos disminuyeron claramente los niveles de IAP-1 e IAP-2, así como los de x-IAP, demostrando que podían regular tanto la vía intrínseca como extrínseca.

## Discusión

Es un hecho reconocido que las células cancerosas pueden evadir la respuesta apoptótica y sobrevivir para formar tumores. Uno de los mecanismos más utilizados por las células tumorales para evadir la respuesta apoptótica implica la disminución de los niveles del gen supresor de tumores p53. p53 es un factor de transcripción que controla el estado del ADN, e inhibe la progresión del ciclo celular permitiendo la reparación del ADN, si éste es pequeño, o induciendo la muerte por apoptosis de la célula lesionada si el daño es irreparable. Así, la mayor parte de los tumores humanos presentan alterados los niveles de p53. Cuando se trataron las células con los compuestos objeto de estudio, observamos una clara inducción de los niveles de p53 en todos los casos, lo que indicaba que p53 también podía estar implicada en los mecanismos de inducción de apoptosis de estos compuestos del mismo modo que ha sido descrito para otros kauranos ya mencionados como oridonina (Wang y col., 2010a).

Especialmente interesantes son los resultados obtenidos tras el tratamiento de diferentes líneas celulares tumorales y cultivos primarios de macrófagos peritoneales con los compuestos objeto de estudio. Es obvio, que para poder establecer el potencial antitumoral de un compuesto es necesario ensayar el mismo en líneas celulares tumorales. En nuestro caso se utilizaron tres líneas celulares humanas, Hela, HepG2 y HT-29 en las cuales se analizó la capacidad de los cuatro compuestos para inducir apoptosis. Según demuestran los resultados obtenidos, todos los compuestos fueron capaces de disminuir la viabilidad celular en todas las líneas tumorales testadas, demostrando su potencial antitumoral. Además, los compuestos **12**, **21** y **23** apenas mostraron toxicidad, a diferencia del compuesto **20**, en un cultivo primario de macrófagos peritoneales, utilizado como modelo de célula normal y/o sana, por lo que podemos concluir que

los compuestos *ent*-kauranos seleccionados (**12**, **21** y **23**) son capaces de disminuir la viabilidad de las células tumorales, siendo relativamente poco citotóxicos para las células sanas, lo que los convierte en firmes candidatos a un estudio más avanzado como agente antitumorales.

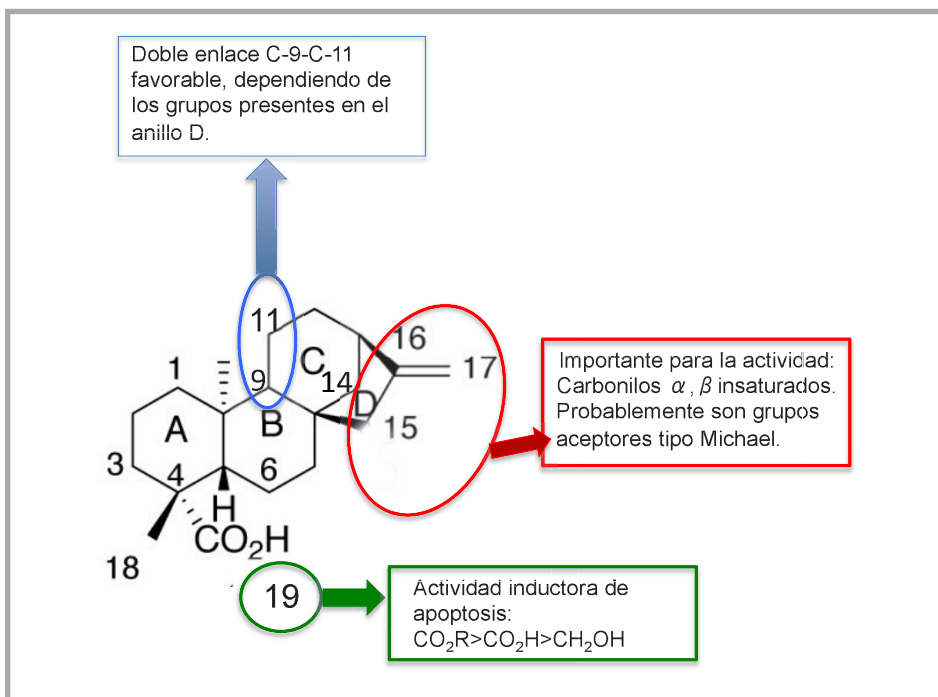
Finalmente, analizamos los efectos de los 34 compuestos objeto de estudio en relación con su estructura química, intentando establecer una posible relación estructura-actividad farmacológica.

Si observamos la Figura 15, en la que se muestran las estructuras químicas de los 34 diterpenos ensayados, podemos evidenciar como las modificaciones desarrollada en ellas, conducen a cambios en la actividad antitumoral.

Si consideramos la *funcionalización del carbono C-14 del anillo A* de los diterpenos kauranos (Figura 28), los compuestos más activos como agentes apoptóticos fueron aquellos que contenían un grupo éster (**2**, **8**, **12**). Los derivados hidroxilados **9** y **25**, que carecen de dicho grupo éster, fueron inactivos, mientras que la esterificación del ácido carboxílico aumentó la actividad de los compuestos (**28** vs **12**, **1** vs **8**, **1** vs **2**). Estos resultados indican que la actividad de los compuestos parece ser favorecida por un incremento de la lipofilia.

La presencia de un *doble enlace C-9-C-11 en el anillo C* no permite concluir acerca de la actividad, ya que dependiendo del tipo de sustituyente en los anillos A y D, este doble enlace favorece o no la actividad citotóxica. Así cuando el doble enlace exocíclico C-16-C17 está presente sólo en el anillo D, la actividad aumenta con el doble enlace adicional endocíclico (**16** es más activo que **1** y lo mismo ocurre con **17** vs **2** y **25** vs **9**). Por el contrario, los derivados **23** y **22** que contienen un grupo funcional en el

## Discusión



**Figura 28.- Relación estructura química-actividad farmacológica de los diterpenos kauranos.**

carbono C-15 y un doble enlace entre C-9-C11 fueron menos activos que sus derivados correspondientes, **12** y **30** respectivamente, que no contienen el mencionado doble enlace. Esto se corrobora con la comparación entre la pareja de diterpenos **14** y **18**, dónde la presencia de un doble enlace en el segundo se ve acompañada de una disminución de la actividad apoptótica.

Para evaluar la influencia de los sustituyentes de distinta naturaleza presentes en el *anillo ciclopentano D*, se llevaron a cabo una serie de modificaciones. Los mejores resultados de actividad se lograron con aquellos compuestos que tenían un grupo carbonilo  $\alpha, \beta$ -insaturado,

(compuestos **20**, **12** y **23**), seleccionados en la presente Tesis Doctoral. La sustitución de estos grupos por grupos acetoxi o hidroxilo (derivados **22**, **26**, **30**, **19** y **27**) condujo a la pérdida de la actividad. Si el doble enlace del motivo  $\alpha,\beta$ -insaturado era modificado, la actividad disminuía, lo que se aprecia al comparar **12** vs **29**, **12** vs **13** y **11** vs **6**, en los que los últimos de cada pareja carecen de este doble enlace. Estos resultados destacan la importancia de este agrupamiento y su posible actuación como aceptor tipo Michael con residuos nucleófilos presentes en la diana.

El compuesto activo **21**, objeto de evaluación de esta Tesis Doctoral, presenta un anillo de cinco miembros en una disposición diferente a la habitual para los *ent*-kaurenos, siendo un esqueleto diferente formado a través de un reagrupamiento oxidativo del derivado **17**, hecho que aparentemente favorece la citotoxicidad.

Como se ha descrito anteriormente los compuestos seleccionados **12**, **20** y **23** presentan en su estructura un grupo carbonilo insaturado. Estos grupos poseen propiedades electrofílicas, provocando toxicidad a través de un mecanismo que implica la formación de aductos de Michael con proteínas que presentan grupos nucleofílicos, especialmente grupos sulfidrilos de las cisteínas (Lyss y col., 1998). Entre estas proteínas destacan las caspasas cuya actividad enzimática es sensible a las modificaciones de dichos residuos de cisteína. De hecho, todas las moléculas que presentaban dichos grupos fueron tóxicas para las células tumorales, observando además que cuando el resto carbonílico se reemplazaba en los compuestos por otro grupo, bien un grupo hidroxilo o un grupo acetoxilo, se producía una pérdida de actividad.

## V.2. LOS KAURANOSY SU POTENCIAL INMUNOSUPRESOR

Es evidente, que la supresión de las funciones del sistema inmunitario provoca graves trastornos que pueden conducir a la muerte de los seres vivos en un plazo no muy largo de tiempo. Uno de los ejemplos más claros de las consecuencias que puede tener la pérdida de los mecanismos de defensa, lo constituye la infección con el virus VIH, causante del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida). Sin embargo, existen determinadas circunstancias en las que la supresión parcial de la respuesta inmunitaria es la única medida terapéutica eficaz para la lucha contra enfermedades, como ocurre en el rechazo de injertos y las enfermedades autoinmunes. En la primera, el organismo reacciona frente a los antígenos extraños produciendo anticuerpos que destruyen el órgano injertado. En las enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso, miastemia gravis, artritis reumatoide, dermatitis atópica, etc., el organismo pierde la capacidad de distinguir entre lo propio y lo ajeno, produciendo autoanticuerpos que reaccionan contra los propios antígenos. Para todos estos casos, la administración de fármacos inmunosupresores es, hasta el momento, la única medida terapéutica que permite evitar el rechazo de los órganos trasplantados y paliar los síntomas de las enfermedades autoinmunes.

Aunque existe un amplio rango de fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, metotrexato, azatioprina, etc, utilizados habitualmente en la clínica, uno de los principales problemas derivados de su uso es el alto grado de toxicidad que presentan, por lo

que existe una constante demanda de nuevos compuestos con menor toxicidad y mayor capacidad inmunosupresora.

Al igual que ocurría con los compuestos antitumorales, las plantas constituyen una de las principales fuentes de obtención de nuevos compuestos con actividad inmunosupresora. Así, especies vegetales como *Salvia miltiorrhiza*, *Curcuma longa*, *Camellia sinensis* o *Allium sativa* (Amirghofran, 2012), han sido estudiadas ampliamente como potenciales moduladores del sistema inmune. Del mismo modo, derivados de kauranos como oridonina, han demostrado tener efectos inmunosupresores, disminuyendo la proliferación de células inmunes a través de mecanismos que incluyen la regulación de la replicación del ADN, regulación del ciclo celular e inhibición de la secreción de citocinas (Liu y col., 2006).

Una de las principales características que presentan las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico, es la excesiva proliferación de linfocitos T autorreactivos (VanderBorghet y col., 2001). La activación de los linfocitos T sucede normalmente tras la interacción del antígeno con el receptor TCR del linfocito. Esta activación de células T implica la expresión de nuevas moléculas en la superficie de las células, la secreción de citocinas y la inducción de actividad mitótica lo que conduce a la proliferación y diferenciación. Por ello, en la segunda parte de este trabajo de Tesis, se evaluó la acción que ejercían los cuatro *ent*-kauranos **12, 20, 21 y 23**, objeto de estudio en la primera parte, sobre la proliferación de los linfocitos T. Para ello utilizamos la línea celular de leucemia humana Jurkat E6, a la que tratamos con PMA/IoM como mitógenos inductores de la activación de dichas células, en presencia y ausencia de los derivados de *ent*-kauranos. Cuando analiza-



## Discusión

mos los efectos de los compuestos sobre la viabilidad de las células mediante ensayos de XTT, observamos que a excepción del compuesto **12**, ninguno de los derivados indujo toxicidad en las células.

Uno de los mecanismos esenciales utilizados por el organismo para eliminar a las células T activadas una vez cumplida su función es la apoptosis. De hecho se ha descrito que varios compuestos inmunosupresores son capaces de inducir la apoptosis de las células T activadas (Nagahara y col., 2000). Mediante técnicas de citometría de flujo, determinamos los niveles de apoptosis inducidos en presencia de los compuestos observando que mientras que los compuestos **12 y 21** inducían apoptosis, ni el compuesto **20**, ni el **23** modificaron la viabilidad de las células. Así pues, de los datos obtenidos en ambos ensayos, cabía concluir que los compuestos **20 y 23** carecían de toxicidad aparente frente a las células Jurkat E6, por lo que decidimos analizar sus efectos sobre la proliferación celular.

Como hemos comentado previamente, tras la activación de los linfocitos T se pone en marcha un programa bien definido que conduce a la producción de citocinas, entre las que destaca la IL-2 (Van-Oers, 1999). Las células T activadas expresan el receptor de IL-2 de alta afinidad y secretan IL-2; la unión de esta citocina a su receptor de alta afinidad señala a la célula T para entrar en ciclo celular (van Leeuwen y Samelson, 1999). Para analizar los efectos de los compuestos **20 y 23** sobre la proliferación de las células, en nuestro ensayo se utilizó un análogo estructural de la timidina, la bromo-deoxiuridina, acoplado a un sistema de detección colorimétrica. Los datos obtenidos indican que ambos compuestos **20 y 23** fueron capaces de disminuir la proliferación de las células Jurkat E6 de manera dosis-dependiente, aunque el compuesto **23** presentó mayor actividad a bajas dosis. Además, ambos compuestos disminuyeron el nivel de

proliferación linfocitaria en mayor medida que la dexametasona a las mismas concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ .

La disminución de la proliferación linfocitaria una vez activada la célula puede ser debida a varias causas, incluyendo que las células quiescentes no entren en el ciclo celular o que éste se detenga en algún punto antes de la síntesis de ADN. Se trató de establecer si nuestros compuestos interferían en el ciclo celular, para lo que se llevó a cabo un ensayo por citometría de flujo. Los datos indican que ambos compuestos son capaces de detener el ciclo celular de los linfocitos activados en la fase Go/G1, ya que las células tratadas aumentan en la fase Go con respecto al control, mientras que este nivel disminuye en la fase de síntesis.

Todos los resultados obtenidos apuntaban a que la inhibición de la activación de los linfocitos T observada en presencia de los compuestos **20** y **23** se debía principalmente a la interferencia en la replicación del ADN en la fase G1 y la regulación del ciclo celular y desde luego en menor medida a una disminución en los niveles de los linfocitos.

Por último, quisimos averiguar si la disminución de la proliferación de los linfocitos observada se podría deber también a la interferencia de nuestros compuestos con la producción de IL-2. Ambos compuestos fueron capaces de disminuir significativamente los niveles de IL-2 en los linfocitos activados, siendo la acción más acentuada en el caso del compuesto **20**. Sin embargo el descenso causado por la dexametasona, corticoide de amplio uso clínico como inmunosupresor en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, fue más intenso que el de los dos compuestos objeto de este estudio.

## Discusión

Todos los datos obtenidos nos permiten concluir que los *ent-kauranos* estudiados, serían capaces de suprimir la respuesta inmunológica de los linfocitos activados a varios niveles:

- Los compuestos **12 y 21** podrían ejercer una acción inmunosupresora activando la delección de linfocitos autorreactivos a través de mecanismos de toxicidad e induciendo apoptosis.
- Los compuestos **20 y 23** inhibirían la proliferación de los linfocitos ya activados, inhibiendo la síntesis del ADN, posiblemente por un mecanismo que mantiene a las células en fase Go y por lo tanto, no permitiendo a las células quiescentes entrar en el ciclo celular. Además, son también capaces de disminuir los niveles de IL-2, por lo que la célula activada, carecerá de la citocina necesaria para su proliferación y para la progresión de la respuesta inmune.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis indican que los derivados de *ent-kauranos* evaluados podrían tener un potencial terapéutico y ser útiles para tratamiento de patologías tan importantes como el cáncer y las enfermedades autoinmunes.



## CONCLUSIONES

---





## VI. CONCLUSIONES.

1. De la serie química de 34 diterpenos de tipo kaurano evaluada, solo los compuestos **12**, **20**, **21** y **23** presentaron efectos citotóxicos.
2. Dichos efectos citotóxicos estan mediados por inducción de apoptosis, vía activación de caspasas.
3. Ninguno de los compuestos produjo toxicidad en células no tumorales.
4. Los estudios de relación estructura química-actividad, pusieron de manifiesto que los compuestos que presentaban en su estructura un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado (**12**, **20** y **23**) fueron los más activos. Dicho grupo permite la formación de aductos de tipo Michael con residuos nucleofílicos presentes en proteínas.
5. Respecto a la actividad inmunomoduladora de los cuatro compuestos objeto de estudio analizados, tan solo el compuesto **12** indujo toxicidad en células Jurkat E6.
6. Los compuestos **20** y **23** fueron capaces de disminuir la proliferación de linfocitos deteniendo el ciclo celular en fase Go/G1, además de disminuir los niveles de IL-2.





## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS







## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abbas, A.B.: "Antigen recognition in the adaptative immune system". En: "*Basic Immunology*". (Abbas AB, Lichtmann AH, Eds) 2ªed. Sanders (Elsevier), Boston, MA pg. 103-111, 1987.

Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. (1996). Functional diversity of Helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93.

Aichele, P., Bachmann, M. F., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1996). Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev* **152**, 21-45.

Amirghofran, Z. (2012). Herbal medicines for immunosuppression. *Iran J Allergy Asthma Immunol* **11**, 111-19.

Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-8.

Ban, J. O., Oh, J. H., Hwang, B.Y., Moon, D. C., Jeong, H. S., Lee, S., Kim, S., Lee, H., Kim, K. B., Han, S. B. & Hong, J.T. (2009). Inflexinol inhibits colon cancer cell growth through inhibition of nuclear factor-kappaB activity via direct interaction with p50. *Mol Cancer Ther* **8**, 1613-24.

Barnaba, V. & Sinigaglia, F. (1997). Molecular mimicry and T cell-mediated autoimmune disease. *J Exp Med* **185**, 1529-31.

Bauer L.: "Signalweg der Apoptose" en *Forschung Textbuch Pharmakologie und Toxikologie* (Schmidt D., Bauer L., Nunner N. Eds) 4ªed. Topp Verlag, Marburg, pg. 124, 1998.

Bedoya, L. M., Marquez, N., Martinez, N., Gutierrez-Eisman, S., Alvarez, A., Calzado, M. A., Rojas, J. M., Appendino, G., Munoz, E. & Alcami, J. (2009). SJ23B, a jatrophone diterpene activates classical PKCs and displays strong activity against HIV in vitro. *Biochem Pharmacol* **77**, 965-78.

Bonito, M. C., Cicala, C., Marcotullio, M. C., Maione, F. & Mascolo, N. (2011). Biological activity of bicyclic and tricyclic diterpenoids from *Salvia* species of immediate pharmacological and pharmaceutical interest. *Nat Prod Commun* **6**, 1205-15.

## Referencias Bibliográficas

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Buys, C. H. (2000). Telomeres, telomerase, and cancer. *N Engl J Med* **342**, 1282-3.
- Carretta, M. D., Alarcon, P., Jara, E., Solis, L., Hancke, J. L., Concha, I., Hidalgo, M. A. & Burgos, R. A. (2009). Andrographolide reduces IL-2 production in T-cells by interfering with NFAT and MAPK activation. *Eur J Pharmacol* **602**, 413-21.
- Cavalcanti, B. C., Bezerra, D. P., Magalhaes, H. I., Moraes, M. O., Lima, M. A., Silveira, E. R., Camara, C. A., Rao, V. S., Pessoa, C. & Costa-Lotufo, L. V. (2009). Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. *J Appl Toxicol* **29**, 560-8.
- Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**, 1559-64.
- Chao, H. P., Kuo, C. D., Chiu, J. H. & Fu, S. L. (2010). Andrographolide exhibits anti-invasive activity against colon cancer cells via inhibition of MMP2 activity. *Planta Med* **76**, 1827-33.
- Chinou, I. (2005). Labdanes of natural origin-biological activities (1981-2004). *Curr Med Chem* **12**, 1295-317.
- Cuadrado, I., Cidre, F., Herranz, S., Estevez-Braun, A., de las Heras, B. & Hortelano, S. (2012). Labdanolic acid methyl ester (LAME) exerts anti-inflammatory effects through inhibition of TAK-1 activation. *Toxicol Appl Pharmacol* **258**, 109-17.
- Dass, C. R. (2004). Tumour angiogenesis, vascular biology and enhanced drug delivery. *J Drug Target* **12**, 245-55.
- de las Heras, B. & Hortelano, S. (2009). Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflamm Allergy Drug Targets* **8**, 28-39.
- de las Heras, B., Rodriguez, B., Bosca, L. & Villar, A. M. (2003). Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Curr Top Med Chem* **3**, 171-85.

Deveraux, Q. L. & Reed, J. C. (1999). IAP family proteins suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-52.

Dewick P.M: "The mevalonate and Deoxyxylulose phosphate pathways: Terpenoids and steroids". En: *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. (Dewick PM, Ed) J Wiley, Sussex, 2ª ed., pg. 203-212, 2006.

Dimas, K., Papadaki, M., Tsimplouli, C., Hatziantoniou, S., Alevizopoulos, K., Pantazis, P. & Demetzos, C. (2006). Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomed Pharmacother* **60**, 127-33.

Ding, L., Liu, G. A., Yang, D. J., Wang, H., Wang, L. & Sun, K. (2005). Cytotoxic ent-kaurane diterpenoids from *Isodon weisiensis* C.Y.Wu. *Pharmazie* **60**, 458-60.

dos Santos, A. G., Ferreira, P. M., Vieira Junior, G. M., Perez, C. C., Gomes Tininis, A., Silva, G. H., Bolzani Vda, S., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa Cdo, O. & Cavaleiro, A. J. (2010). Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chem Biodivers* **7**, 205-15.

Droin, N. M. & Green, D. R. (2004). Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 179-88.

Edinger, A. L. & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 663-9.

Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. & Rohdich, F. (2004). Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1401-26.

Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W. & Nagata, S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **380**, 723-26.

Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**, 719-27.

Ferguson, T. A. & Griffith, T. S. (1997). A vision of cell death: insights into immune privilege. *Immunol Rev* **156**, 167-84.

## Referencias Bibliográficas

- Fridman, J. S. & Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-40.
- Gao, L. W., Zhang, J., Yang, W. H., Wang, B. & Wang, J. W. (2011). Glaucocalyxin A induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through mitochondria-mediated death pathway. *Toxicol In Vitro* **25**, 51-63.
- Gong, Y., Li, Y., Abdolmaleky, H. M., Li, L. & Zhou, J. R. (2012). Tanshinones inhibit the growth of breast cancer cells through epigenetic modification of Aurora A expression and function. *PLoS One* **7**, e33656.
- Goodnow, C. C. (1997). Glimpses into the balance between immunity and self-tolerance. *Ciba Found Symp* **204**, 190-202; discussion 202-7.
- Green, D. R. & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-12.
- Han, R., Rostami-Yazdi, M., Gerdes, S. & Mrowietz, U. (2012). Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune-mediated inflammatory diseases. *Br J Clin Pharmacol* **74**, 424-36.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Harvey, A. L. (2007). Natural products as a screening resource. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 480-4.
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* **13**, 894-901.
- Harvey, A. L., Clark, R. L., Mackay, S. P. & Johnston, B. F. (2010). Current strategies for drug discovery through natural products. *Expert Opin Drug Discov* **5**, 559-68.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**, 4077-85.
- Hortelano, S., Zeini, M., Castrillo, A., Alvarez, A. M. & Bosca, L. (2002). Induction of apoptosis by nitric oxide in macrophages is independent of apoptotic volume decrease. *Cell Death Differ* **9**, 643-50.

- Hou, Y., Wang, H. Q. & Ba, Y. (2012). Effects of CDC7 gene silencing and rituximab on apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **138**, 2027-34.
- Huang, M., Zhang, H., Liu, T., Tian, D., Gu, L. & Zhou, M. (2013). Triptolide Inhibits MDM2 and Induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells through a p53-independent pathway. *Mol Cancer Ther* **12**, 184-94.
- Ikezoe, T., Yang, Y., Bandobashi, K., Saito, T., Takemoto, S., Machida, H., Togitani, K., Koeffler, H. P. & Taguchi, H. (2005). Oridonin, a diterpenoid purified from *Rabdosia rubescens*, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF-kappa B signal pathways. *Mol Cancer Ther* **4**, 578-86.
- Jang, B. C., Lim, K. J., Choi, I. H., Suh, M. H., Park, J. G., Mun, K. C., Bae, J. H., Shin, D. H. & Suh, S. I. (2007). Triptolide suppresses interleukin-1beta-induced human beta-defensin-2 mRNA expression through inhibition of transcriptional activation of NF-kappaB in A549 cells. *Int J Mol Med* **19**, 757-63.
- Jin, S., Shen, J. N., Wang, J., Huang, G. & Zhou, J. G. (2007). Oridonin induced apoptosis through Akt and MAPKs signaling pathways in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther* **6**, 261-68.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. (2006). The role of apoptosis in cancer cell survival and therapeutic outcome. *Cancer Biol Ther* **5**, 1429-42.
- Kondoh, M., Suzuki, I., Sato, M., Nagashima, F., Simizu, S., Harada, M., Fujii, M., Osada, H., Asakawa, Y. & Watanabe, Y. (2004). Kaurene diterpene induces apoptosis in human leukemia cells partly through a caspase-8-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 115-22.
- Kumrit, I., Suksamrarn, A., Meepawpan, P., Songsri, S. & Nuntawong, N. (2010). Labdane-type diterpenes from *Hedychium gardnerianum* with potent cytotoxicity against human small cell lung cancer cells. *Phytother Res* **24**, 1009-13.

## Referencias Bibliográficas

- Kunnumakkara, A. B., Ichikawa, H., Anand, P., Mohankumar, C. J., Hema, P. S., Nair, M. S. & Aggarwal, B. B. (2008). Coronarin D, a labdane diterpene, inhibits both constitutive and inducible nuclear factor-kappa B pathway activation, leading to potentiation of apoptosis, inhibition of invasion, and suppression of osteoclastogenesis. *Mol Cancer Ther* **7**, 3306-17.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-85.
- Lam, K. S. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol* **15**, 279-89.
- Lane, D. (2004). Curing cancer with p53. *N Engl J Med* **350**, 2711-2.
- Lee, J. H., Koo, T. H., Hwang, B. Y. & Lee, J. J. (2002). Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kappa B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-kappa B target genes. *J Biol Chem* **277**, 18411-20.
- Li, C. Y., Wang, E. Q., Cheng, Y. & Bao, J. K. (2011). Oridonin: An active diterpenoid targeting cell cycle arrest, apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 701-4.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Lim, J. C., Chan, T. K., Ng, D. S., Sagineedu, S. R., Stanslas, J. & Wong, W. S. (2012). Andrographolide and its analogues: versatile bioactive molecules for combating inflammation and cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **39**, 300-10.
- Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. & Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-15.
- Liu, J., Yang, F., Zhang, Y. & Li, J. (2007). Studies on the cell-immunosuppressive mechanism of Oridonin from *Isodon serra*. *Int Immunopharmacol* **7**, 945-54.

- Liu, J. J., Huang, R. W., Lin, D. J., Peng, J., Zhang, M., Pan, X., Hou, M., Wu, X. Y., Lin, Q. & Chen, F. (2006). Ponicedin, an ent-kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPES, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in lung cancer cells in vitro. *Cancer Invest* **24**, 136-48.
- Liu, J. J., Huang, R. W., Lin, D. J., Wu, X. Y., Peng, J., Pan, X. L., Song, Y. Q., Lin, Q., Hou, M., Wang, D. N., Chen, F. & Zhang, M. H. (2005). Oridonin-induced apoptosis in leukemia K562 cells and its mechanism. *Neoplasma* **52**, 225-30.
- Liu, Z., Ouyang, L., Peng, H. & Zhang, W. Z. (2012). Oridonin: targeting programmed cell death pathways as an anti-tumour agent. *Cell Prolif* **45**, 499-507.
- Lyss, G., Knorre, A., Schmidt, T. J., Pahl, H. L. & Merfort, I. (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J Biol Chem* **273**, 33508-16.
- Mahaira, L. G., Tsimplouli, C., Sakellaris, N., Alevizopoulos, K., Demetzos, C., Han, Z., Pantazis, P. & Dimas, K. (2011). The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action. *Eur J Pharmacol* **666**, 173-82.
- Mang, C., Jakupovic, S., Schunk, S., Ambrosi, H. D., Schwarz, O. & Jakupovic, J. (2006). Natural products in combinatorial chemistry: an andrographolide-based library. *J Comb Chem* **8**, 268-74.
- Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer* **2**, 143-48.
- Mattson, M. P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 120-29.
- McDevitt, H. O. (2000). Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. *Annu Rev Immunol* **18**, 1-17.
- Mevorach, D., Trahtemberg, U., Krispin, A., Attalah, M., Zazoun, J., Tabib, A., Grau, A. & Verbovetski-Reiner, I. (2010). What do we mean when we write "senescence," "apoptosis," "necrosis," or "clearance of dying cells"? *Ann NY Acad Sci* **1209**, 1-9.



## Referencias Bibliográficas

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Muñoz-Pinedo, C. (2012). Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense. *Adv Exp Med Biol* **738**, 124-43
- Nagahara, Y., Enosawa, S., Ikekita, M., Suzuki, S. & Shinomiya, T. (2000). Evidence that FTY720 induces T cell apoptosis in vivo. *Immunopharmacology* **48**, 75-85.
- Nakanishi, K. (2001). Innate and acquired activation pathways in T cells. *Nat Immunol* **2**, 140-42.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* **66**, 1022-37.
- Pratheeshkumar, P., Sheeja, K. & Kuttan, G. (2012). Andrographolide induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by inhibiting NF-kappaB-mediated bcl-2 activation and modulating p53-induced caspase-3 gene expression. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **34**, 143-51.
- Qi, X., Zhang, D., Xu, X., Feng, F., Ren, G., Chu, Q., Zhang, Q. & Tian, K. (2012). Oridonin nanosuspension was more effective than free oridonin on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in the human pancreatic cancer PANC-1 cell line. *Int J Nanomedicine* **7**, 1793-804.
- Roitt IM, Cooke A (1987). The role of autoantigen in autoimmunity. *Immunol Lett* **16**, 259-263.
- Ruiz, Y., Rodrigues, J., Arvelo, F., Usubillaga, A., Monsalve, M., Diez, N. & Galindo-Castro, I. (2008). Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. *Phytochemistry* **69**, 432-38.
- Sabandar, C. W., Ahmat, N., Jaafar, F. M. & Sahidin, I. (2013). Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. *Phytochemistry* **85**, 7-29.

- Sakaguchi, S., Toda, M., Asano, M., Itoh, M., Morse, S. S. & Sakaguchi, N. (1996). T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* **9**, 211-20.
- Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K. & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2979-99.
- Samelson, L. E. (2002). Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol* **20**, 371-94.
- Sartippour, M. R., Seeram, N. P., Heber, D., Hardy, M., Norris, A., Lu, Q., Zhang, L., Lu, M., Rao, J. Y. & Brooks, M. N. (2005). *Rabdosia rubescens* inhibits breast cancer growth and angiogenesis. *Int J Oncol* **26**, 121-27.
- Schatz, D. G. & Malissen, B. (2002). Lymphocyte development. *Curr Op Immunol* **14**, 183-185
- Schuler, M. & Green, D. R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* **29**, 684-88.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* **48**, 4827-33.
- Shen, Y. C., Wang, L. T., Wang, C. H., Khalil, A. T. & Guh, J. H. (2004). Two new cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **52**, 108-10.
- Souza-Fagundes, E. M., Gazzinelli, G., Parreira, G. G., Martins-Filho, O. A., Amarante-Mendes, G. P., Correa-Oliveira, R. & Zani, C. L. (2003). In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. *Int Immunopharmacol* **3**, 383-92.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**, 949-57.

## Referencias Bibliográficas

- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. & Alnemri, E. S. (2001). A conserved x-IAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-16.
- Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. (1998). Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* **1387**, 17-31.
- Swanton, C. (2004). Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol* **5**, 27-36.
- Tan, W., Lu, J., Huang, M., Li, Y., Chen, M., Wu, G., Gong, J., Zhong, Z., Xu, Z., Dang, Y., Guo, J., Chen, X. & Wang, Y. (2011). Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chin Med* **6**, 27-42.
- Traves, P. G., Lopez-Fontal, R., Cuadrado, I., Luque, A., Bosca, L., de Las Heras, B. & Hortelano, S. (2013). Critical role of the death receptor pathway in the antitumoral effects induced by hispanolone derivatives. *Oncogene* **32**, 259-68.
- Van Leeuwen, J. E. & Samelson, L. E. (1999). T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* **11**, 242-48.
- Van Oers, N. S. (1999). T cell receptor-mediated signs and signals governing T cell development. *Semin Immunol* **11**, 227-37.
- VanderBorgh, A., Geusens, P., Raus, J. & Stinissen, P. (2001). The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum* **31**, 160-75.
- Vieira-Junior, G. M., Dutra, L. A., Ferreira, P. M., de Moraes, M. O., Costa Lotufo, L. V., Pessoa Cdo, O., Torres, R. B., Boralle, N., Bolzani Vda, S. & Cavaleiro, A. J. (2011). Cytotoxic clerodane diterpenes from *Casearia rupestris*. *J Nat Prod* **74**, 776-81.
- Vignali, D. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**, 523-32.
- Wagener C.: "Die Tumorzelle". En: *Molekulare Onkologie*. (Wagener C, Müller O, Eds). 3ªed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pg 177-79, 2010.

- Wang, H., Ye, Y., Chui, J. H., Zhu, G. Y., Li, Y. W., Fong, D. W. & Yu, Z. L. (2010a). Oridonin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK and p53 signaling pathways in HepG2 cells. *Oncol Rep* **24**, 647-51.
- Wang, W., Wang, J., Dong, S. F., Liu, C. H., Italiani, P., Sun, S. H., Xu, J., Boraschi, D., Ma, S. P. & Qu, D. (2010b). Immunomodulatory activity of andrographolide on macrophage activation and specific antibody response. *Acta Pharmacol Sin* **31**, 191-201.
- Wang, L., Li, D., Wang, C., Zhang, Y. & Xu, J. (2011). Recent progress in the development of natural ent-kaurane diterpenoids with anti-tumor activity. *Mini Rev Med Chem* **11**, 910-19.
- Willingham, A. T., Deveraux, Q. L., Hampton, G. M. & Aza-Blanc, P. (2004). RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene* **23**, 8392-400.
- Xu, H. Z., Huang, Y., Wu, Y. L., Zhao, Y., Xiao, W. L., Lin, Q. S., Sun, H. D., Dai, W. & Chen, G. Q. (2010). Pharicin A, a novel natural ent-kaurene diterpenoid, induces mitotic arrest and mitotic catastrophe of cancer cells by interfering with BubR1 function. *Cell Cycle* **9**, 2897-907.
- Yan, Y. H., Shang, P. Z., Lu, Q. J. & Wu, X. (2012). Triptolide regulates T cell-mediated immunity via induction of CD11c(low) dendritic cell differentiation. *Food Chem Toxicol* **50**, 2560-64.
- Zhang, Y., Liu, J., Jia, W., Zhao, A. & Li, T. (2005). Distinct immunosuppressive effect by *Isodon serra* extracts. *Int Immunopharmacol* **5**, 1957-65.
- Zhao, D., Lin, F., Wu, X., Zhao, Q., Zhao, B., Lin, P., Zhang, Y. & Yu, X. (2012). Pseudolaric acid B induces apoptosis via proteasome-mediated Bcl-2 degradation in hormone-refractory prostate cancer DU145 cells. *Toxicol In Vitro* **26**, 595-602.
- Zhou, Z. L., Yang, Y. X., Ding, J., Li, Y. C. & Miao, Z. H. (2012). Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms. *Nat Prod Rep* **29**, 457-75.
- Zinkel, S., Gross, A. & Yang, E. (2006). Bcl-2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* **13**, 1351-59.





## SUMMARY

---





## VIII. SUMMARY

### Introduction.

Natural products have been the single most productive source for drug discovery. Among them, terpenes are the largest and most widespread class of secondary metabolites. Some terpenes have been used for therapeutic purposes for centuries as antibacterial and antitumoral agents. In recent decades, research activity into the clinical potential of this class of compounds has continuously increased as a source of pharmacologically interesting agents. Among them, kaurane diterpenes have been identified from numerous medicinal plants, being used for treatment of inflammation, cancer, and also exhibited potent immunosuppressive activity.

Apoptosis is an evolutionarily conserved cell death program executed by cysteine proteases (caspases), essential for normal tissue homeostasis. Two main activation pathways have been identified, termed the extrinsic and intrinsic pathways. The extrinsic pathway is initiated at the plasma membrane by activation of cell surface death receptors such as Fas/CD95, TNF-R1, and TRAIL. The intrinsic pathway is mediated by mitochondria, and involves the release of proapoptotic factors such as cytochrome *c* from the intramembrane space to the cytosol. Once released, cytochrome *c* and dATP bind to apoptotic proteinase-activating factor-1 (Apaf-1), and this complex, together with adenine nucleotides, promotes the autoactivation of procaspase-9 to caspase 9. This then activates the effector caspases 2, 3, 6, 8, and 10. Release of apoptosis related proteins from mitochondria is controlled by proapoptotic members of the Bcl-2 family such as Bax and Bid. Caspase-8 can activate Bid by cleavage to generate truncated Bid, providing a link between the extrinsic and intrinsic pathways.



## Summary

Caspasa 8 is the main executor of the extrinsic pathway initiated at the plasma membrane by activation of cell surface death receptors, whereas caspase 9 is activated in the intrinsic pathway mediated by mitochondria.

One of the most important advances in cancer research is the recognition that apoptosis is an important phenomenon in cancer chemotherapy. It has been reported that some oncogenic mutations disrupt apoptosis, leading to tumor initiation, progression or metastasis. Thus, targeting critical apoptosis regulators is a promising strategy in cancer therapy.

In addition to cancer therapy, apoptosis is one of the main mechanisms used by the organism for removal of active T lymphocytes. T cells not only play a pivotal role in immune response but T-cell proliferation has been implicated in the pathogenesis of a variety of autoimmune diseases. Moreover, reduction of IL-2 levels or changes in cell cycle progression will lead to a decreased cell proliferation. Compounds affecting T cell proliferation could have a therapeutic potential as immunomodulatory agents.

### Objectives.

The general objective proposed in this thesis was to evaluate the antitumoral and immunomodulatory potential of a series of thirty four *ent*-kaurane diterpenes (**1-34**).

### Results and Discussion.

The biological activities of the kaurane derivatives were focused on apoptotic activity. Evaluation of the cytotoxicity revealed that the most effective compounds inhibiting cell viability were **12**, **20**, **21**, and **23** with

an IC<sub>50</sub> value in the micromolar range. These four diterpenes were selected for a further study of their mechanism of action. Their apoptotic potential was confirmed by flow cytometry analysis, being compound **12** the most potent proapoptotic agent. Cytotoxicity evaluation in a variety of human cancer cell lines such as Hela, HepG2, and HT-29 showed similar effects of these compounds. Of particular interest in this regard is our finding that these compounds have proapoptotic action on tumor cells, whereas no cytotoxic effect were observed for compounds **12**, **21** and **23** in peritoneal macrophages.

Treatment with compounds **12**, **21** and **23** increased the enzymatic activities of caspasas 8, 9 and 3, whereas compound **20** only activated caspasas 9 and 3. Both caspase activity and apoptosis were efficiently inhibited after treatment with the general caspase inhibitor z-VAD. These data demonstrate that compounds **12**, **21** and **23** induce apoptosis via the activation of caspase 8, which can also activate the intrinsic pathway. Nevertheless, compound **20**-dependent apoptosis seems to be mediated by mitochondria pathway. .

Several genes products are known to be important controlling the apoptotic process. Immunoblot analysis revealed that cells exposed to 5  $\mu$ M of the different compounds, showed increased expression levels of p53 and Bax. However, levels of antiapoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-x1, and IAPs decreased. Thus, kaurane derivatives (**12**, **20**, **21**, and **23**) induce apoptosis via both the mitochondrial and membrane death receptor pathways, involving the Bcl-2 family proteins.

Regarding the ability of these compounds to induce apoptosis in T cells, flow cytometry analyses showed that compounds **12** and **21**

## Summary

were able to induce apoptosis in a dose-dependent manner. Nevertheless, compounds **20** and **23** showed significantly less cytotoxic effects, being selected for further evaluation.

These two compounds effectively suppressed the T cell proliferation in a dose-dependent manner and also arrested the cell cycle in Go/G1 stage. Moreover, compound **20** decreased IL-2 levels in a dose-dependent manner.

From the obtained results some structure activity relationships can be established. Related to the apoptosis, the best activities were obtained with those compounds having a  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl group (compounds **12**, **20** and **23**). Replacement of this group by hydroxy or acetoxy groups led to a loss of activity. These results highlighted the importance of this moiety, probably acting as a Michael acceptor with nucleophilic residues present in the proteins involved in the apoptotic process.

## Conclusions.

Taken together, these results provide a role of kaurane derivatives **12**, **20**, **21** and **23** as apoptotic inducers in tumor cells, showing cancer cell-specificity, going to be promising candidates for the development of new therapeutic agents in cancer diseases. The presence of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl group is associated with the antitumoral activity exhibited by these compounds.

In addition, compounds **21** and **23** showed immunosuppressor activity, via inhibition of cell cycle progression and decrease of IL-2 levels. The experimental results suggest potential immunosuppressive action of these compounds.



# ANEXO

---





Contents lists available at ScienceDirect

# Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmc](http://www.elsevier.com/locate/bmc)



## Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of *ent*-kaurane derivatives

Idaira Hueso-Falcón<sup>a,b,†,‡</sup>, Natalia Girón<sup>c,†</sup>, Pilar Velasco<sup>c</sup>, Juan M. Amaro-Luis<sup>d</sup>, Angel G. Ravelo<sup>a,b,‡</sup>, Beatriz de las Heras<sup>c,\*</sup>, Sonsoles Hortelano<sup>e,\*</sup>, Ana Estevez-Braun<sup>a,b,\*,‡</sup>

<sup>a</sup> Instituto Universitario de Bio-Organica 'Antonio González', Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>b</sup> Instituto Canario de Investigaciones del Cáncer (ICIC), Hospital Universitario de La Candelaria, 38010, Tenerife, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Farmacología Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

<sup>e</sup> Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 September 2009

Revised 11 November 2009

Accepted 27 November 2009

Available online 6 December 2009

#### Keywords:

Kaurane derivatives

Cancer

Apoptosis

Caspases

Bcl-2

Death receptors

Mitochondria

### ABSTRACT

Thirty one *ent*-kaurane derivatives were prepared from kaurenoic acid (**1**), grandiflorenic acid (**16**), 15 $\alpha$ -acetoxy-kaurenoic acid (**26**) and 16 $\alpha$ -hydroxy-kaurenoic acid (**31**). They were tested for their ability to inhibit cell viability in the mouse leukemic macrophagic RAW 264.7 cell line. The most effective compounds were **12**, **20**, **21**, and **23**. These were selected for further evaluation in other human cancer cell lines such as Hela, HepG2, and HT-29. Similar effects were obtained although RAW 264.7 cells were more sensitive. In addition, these compounds were significantly less cytotoxic in non-transformed cells. The apoptotic potential of the most active compounds was investigated and they were able to induce apoptosis with compound **12** being the best inducer. The caspase-3, -8 and -9 activities were measured. The results obtained showed that compounds **12**, **21**, and **23** induce apoptosis via the activation of caspase-8, whereas compound **20** induces apoptosis via caspase-9. Immunoblot analysis of the expression of p53, Bax, Bcl-2, Bcl-xl, and IAPs in RAW 264.7 cells was also carried out. When cells were exposed to 5  $\mu$ M of the different compounds, expression levels of p53 and Bax increased whereas levels of antiapoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-xl, and IAPs decreased. In conclusion, kaurane derivatives (**12**, **20**, **21**, and **23**) induce apoptosis via both the mitochondrial and membrane death receptor pathways, involving the Bcl-2 family proteins. Taken together these results provide a role of kaurane derivatives as apoptotic inducers in tumor cells.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Apoptosis is an evolutionarily conserved cell death program executed by cysteine proteases (caspases) that is essential for normal tissue homeostasis and development of organisms.<sup>1</sup> Two main activation pathways have been identified, termed the extrinsic and intrinsic pathways.<sup>2</sup> The extrinsic pathway is initiated at the plasma membrane by activation of cell surface death receptors such as Fas/CD95, TNF-R1, and TRAIL. Ligand-activated death receptors recruit the adaptor molecule Fas-associated death domain protein (FADD), which in turn recruits and activates an initiator enzyme, usually caspase-8, in the death-inducing signaling complex (DISC).<sup>3</sup> Active caspase-8 activates downstream apoptotic effectors such as caspases 3, 6, and 7.<sup>4</sup> The intrinsic pathway is mediated by mitochondria, and

involves the release of proapoptotic factors such as cytochrome c from the intramembrane space to the cytosol. Once released, cytochrome c and dATP bind to apoptotic proteinase-activating factor-1 (Apaf-1), and this complex, together with adenine nucleotides, promotes the autoactivation of procaspase-9 to caspase 9. This then activates the effector caspases 2, 3, 6, 8, and 10.<sup>5</sup> Release of apoptosis-related proteins from mitochondria is controlled by proapoptotic members of the Bcl-2 family such as Bax and Bid. Caspase-8 can activate Bid by cleavage to generate truncated Bid, providing a link between the extrinsic and intrinsic pathways.<sup>6</sup>

One of the most important advances in cancer research is the recognition that apoptosis is an important phenomenon in cancer chemotherapy. A successful anticancer drug should kill or incapacitate cancer cells without causing excessive damage to normal cells. This ideal situation is achievable by selectively inducing apoptosis in cancer cells. Thus, targeting critical apoptosis regulators is a promising strategy in cancer therapy.<sup>7</sup>

Natural products have been the single most productive source of leads for the development of drugs. Approximately, 65% of the anticancer drugs commercially available in Europe and the US

\* Corresponding authors. Tel.: +34 922 318576; fax: +34 922 318571.

E-mail addresses: [lasheras@farm.ucm.es](mailto:lasheras@farm.ucm.es) (B. de las Heras), [hortelano@cnic.es](mailto:hortelano@cnic.es) (S. Hortelano), [aestevebra@ull.es](mailto:aestevebra@ull.es) (A. Estevez-Braun).

† Both authors contributed equally to this paper.

‡ <http://www.icic.es>.

are of natural origin.<sup>8</sup> Natural products have properties distinguishing them from other medicinal chemistry compounds.<sup>9</sup> A large component of biologically relevant chemical space is occupied by natural products which can be regarded as prevalidated by nature.<sup>10</sup> They have a unique and vast chemical diversity and have been optimized for optimal interactions with biological macromolecules through evolutionary selection. Virtually, all of the biosynthesized compounds have a biological activity with (from an evolutionary perspective) beneficial purpose for the organism that produces it, thus fulfilling the requirement for biological relevance. Taken together, these facts make them exceptional as design resources in drug discovery and interest in natural products remains considerable.<sup>11</sup>

The secondary metabolites of diverse life forms have potent biological activities and have provided lead compounds in drug discovery. Terpenoids represent a chemical defense against environmental stress and provided a repair mechanism for wound and injuries. Plant terpenoids have demonstrated excellent anti-cancer properties by suppression of tumor proliferation and induction of apoptosis.<sup>12</sup> Diterpenes with different skeletons have been described in the literature as inducers of apoptosis. Four xenicane-type diterpenoids isolated from the choral *Xenia elongata* induced apoptosis in precancerous mammalian epithelial cells.<sup>13</sup> Macrocyclic lathyrane-type diterpenes from *Euphorbia lagascae* showed high apoptosis-inducing activity.<sup>14</sup> Andrographolide, a labdane diterpenoid isolated from *Andrographis paniculata* also triggers apoptosis and suppresses cancer cell growth.<sup>15</sup> It has also been reported the apoptosis-inducing properties in a human leukemia cell line (HL-60) of *ent*-kaurane-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia truncata*.<sup>16</sup> The proapoptotic effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid on the human prostate carcinoma epithelial cell line PC-3 has been also described.<sup>17</sup>

We have recently published that two kaurane diterpenes, foliol and linearol, interact with the mitochondrial pathway protecting macrophages from NO-dependent apoptosis. In addition, these diterpenes can reduce phagocytosis in cultured peritoneal macrophages and in macrophage cell lines.<sup>18</sup>

Continuing with our interest in the evaluation of the biological potential of natural diterpenes,<sup>19</sup> in the present study we report the preparation of 31 kaurane derivatives from the natural diterpenes kaurenoic acid (**1**), grandiflorenic acid (**16**), 15 $\alpha$ -acetoxy-kaurenoic acid (**26**), and 16 $\alpha$ -hydroxy-kaurenoic acid (**31**), their induction of apoptosis signaling pathway in mouse and human cancer cells and some conclusions about structure–activity relationships. Our results clearly demonstrate that four of these compounds (**12**, **20**, **21**, and **23**) induced apoptosis in a dose-dependent manner through a caspase-dependent mechanism, which may contribute to the chemopreventive functions.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Chemistry

Most of the derivatives were obtained from the natural compounds kaurenoic acid (**1**), grandiflorenic acid (**16**), 15 $\alpha$ -acetoxy-kaurenoic acid (**26**), and 16 $\alpha$ -hydroxy-kaurenoic acid (**31**). These diterpenes are the main secondary metabolites of the *Espeletia* species, resinous plants, popularly known as frailejón, that are characteristic of the high Andean plateaus of Venezuela, Colombia, and Ecuador.<sup>20</sup>

Their structures are constituted by a perhydrophenanthrene unit (A–C rings) fused with a cyclopentane unit (D ring) formed by a bridge of two carbons between C-8 and C-13, this skeleton confers lipophilic properties which is essential to cross membranes and occupy hydrophobic pockets in the target.

#### 2.1.1. Synthesis of kaurenoic acid derivatives (2–15)

From kaurenoic acid (**1**) or kaurenoic acid methyl ester (**2**), we have carried out several transformations on the carboxylic acid function and also on the exocyclic double bond (Scheme 1).

Compound **2** was obtained from **1** after treatment with CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O. Compound **2** under hydrogenation with Pd/C 10% in THF yielded **3**. Epoxidation of the double bond in **2** using MCPBA produced the epoxide isomers (**4**) and (**5**). The main epoxide derivative (**5**) was converted into the aldehyde **6** when treated with BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O in THF. The reaction of compound **6** with NH<sub>2</sub>OH·HCl provided compound **7**. To evaluate the influence in the activity of a voluminous group in the ring A, we obtained the benzyl ester **8**. Compound **1** was reduced to the corresponding alcohol **9** using LiAlH<sub>4</sub>. The allylic oxidation of **2** with SeO<sub>2</sub> afforded the allylic alcohol **10** and the  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde **11**. The posterior oxidation of the derivative **10** produced the  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone **12** which was converted into compound **13** under treatment with ethyl vinyl ether and toluene in a sealed tube at 100 °C. The dihydroxylated ester **14** was obtained from **2** under treatment with OsO<sub>4</sub> while derivative **15** was synthesized using SOCl<sub>2</sub>/MeOH.

#### 2.1.2. Synthesis of grandiflorenic acid derivatives (17–25)

Grandiflorenic acid (**16**) was subjected to similar transformations that those in kaurenoic acid (**1**) (Scheme 2). Thus, **16** was reduced with LiAlH<sub>4</sub> to form the alcohol **25**. Compound **16** was esterified with BnBr yielding derivative **24** and the corresponding methyl ester **17** was obtained under treatment with CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O. The reaction of **17** with OsO<sub>4</sub> afforded **18** in a regioselective form. Compounds **19–21** were obtained when **17** was treated with SeO<sub>2</sub>. The unexpected compound **21** was formed probably via a [2,3] sigmatropic rearrangement. The structure of **21** was unequivocally established on the basis of the correlations observed in the HMBC spectrum and the  $\alpha$ -orientation of the hydroxyl group was determined by the NOE effects detected between the hydrogen H-11 and the methyl group Me-20 and between H-15 and H-5. The derivative **22** was obtained from **19** using usual acetylation conditions and compound **23** was also obtained from **19** after oxidation with PDC.

#### 2.1.3. Synthesis of kaurenoic acid derivatives (27–30)

Derivatives (**27–30**) were obtained from natural 15 $\alpha$ -acetoxy-kaurenoic acid (**26**) following the reactions shown in Scheme 3. Basic hydrolysis of **26** yielded the hydroxyl derivative **27**, which was subsequently oxidized with Jones reagent to afford the corresponding carbonyl compound **28**. The treatment of **28** with CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> yielded the pirazoline (**29**), which was formed through a 1,3-dipolar cycloaddition reaction between the activated double bond and the diazo compound.

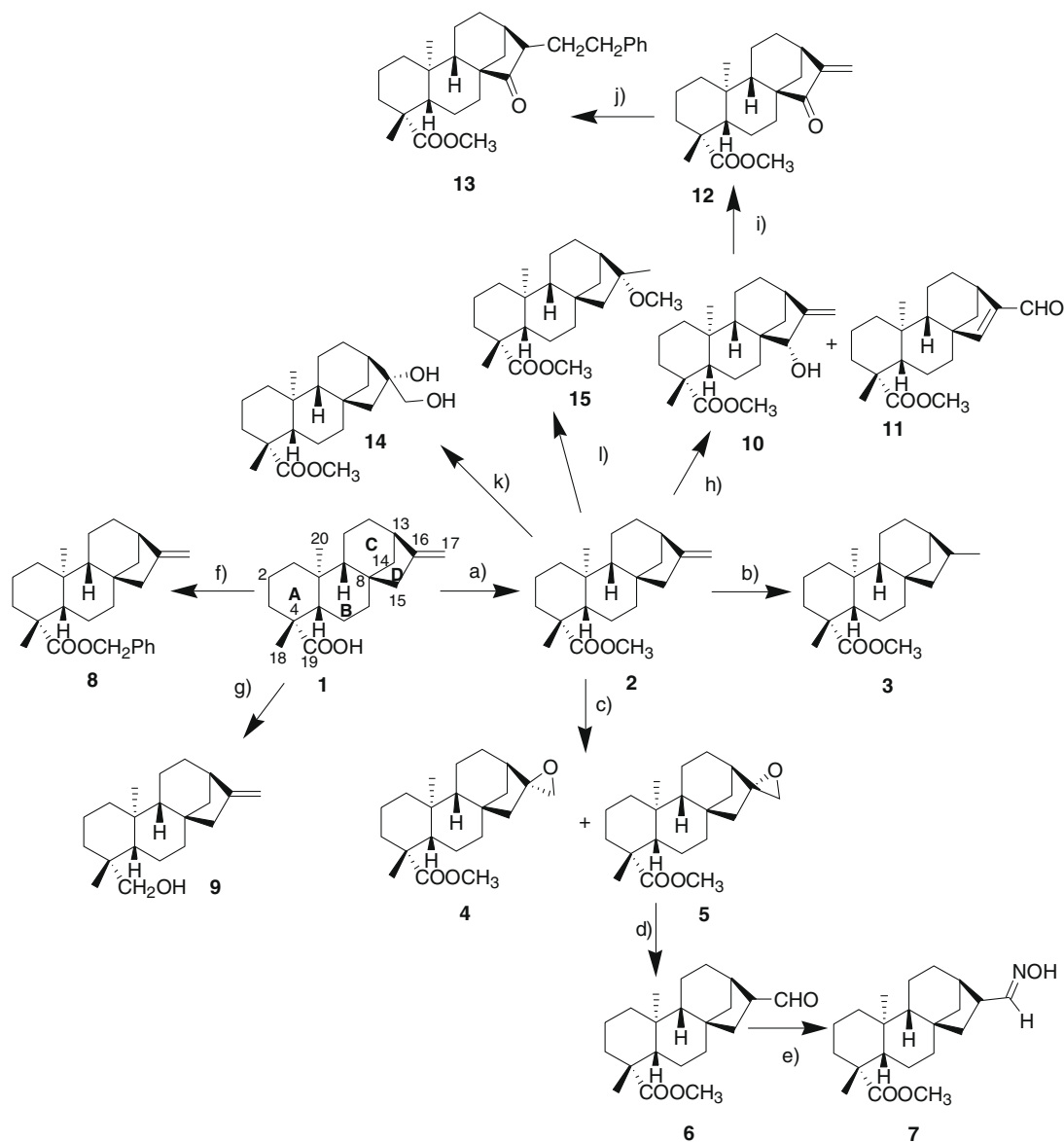
#### 2.1.4. Synthesis of kaurenoic acid derivatives (32–34)

Compounds **32–34** were obtained from natural 16 $\alpha$ -hydroxy-kaurenoic acid (**31**) (Scheme 4). Derivative **32** was formed by methylation of **31** which under treatment with thionyl chloride yielded compounds **2**, **33**, and **34**.

### 2.2. Biological assays and SAR

#### 2.2.1. *ent*-Kaurane derivatives decrease cell viability in tumor cells

To establish the potential use of these compounds, the obtained derivatives were tested for their ability to inhibit cell viability in the mouse leukemic macrophagic RAW 264.7 cell line. The IC<sub>50</sub> values are shown in Table 1. Twelve compounds were able to inhibit cell viability in the range of 1–25  $\mu$ M. The most effective compounds were compound **12** (IC<sub>50</sub> = 1  $\mu$ M) and compounds **20**, **21**, and **23** with an IC<sub>50</sub> value of 5  $\mu$ M.



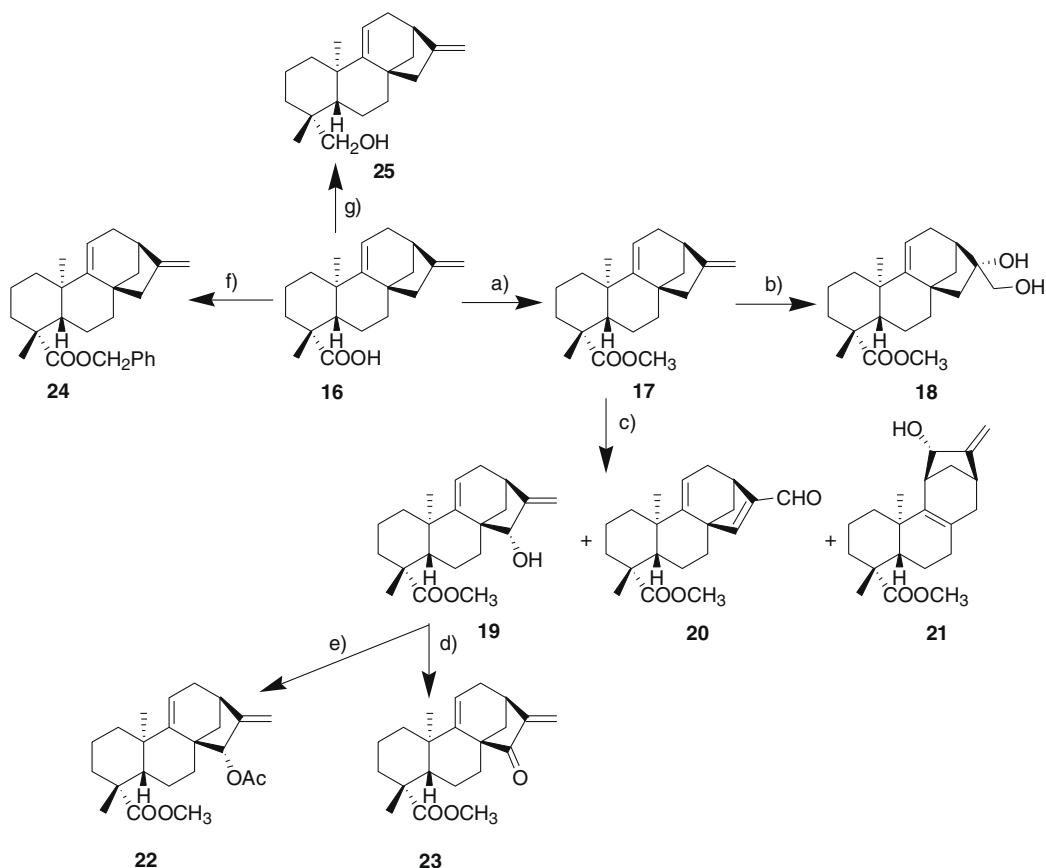
**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{CH}_2\text{N}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 24 h; (b)  $\text{H}_2$ , Pd/C 10%, THF, 24 h; (c) MCPBA 70%, DCM,  $\text{NaHCO}_3$ , 25 min; (d)  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ , THF; (e)  $\text{H}_2\text{NOH}\cdot\text{HCl}$ , AcONa,  $\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, 16 h; (f)  $\text{BnBr}$ , acetone, 6 h; (g)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 3 h; (h)  $\text{SeO}_2$ , DCM, 24 h; (i) PDC, DCM, 24 h; (j) toluene, sealed tube  $100^\circ\text{C}$ , 70 h; (k)  $\text{OsO}_4$ , NMO,  $^t\text{BuOH/THF/H}_2\text{O}$  7:2:1, 23 h; (l)  $\text{SOCl}_2/\text{MeOH}$ , reflux, 15 h.

In addition, compounds **12**, **20**, **21**, and **23** were also tested in several human and mouse tumor cell lines. As we can observe in Figure 1 and Table 1, similar effects were observed in all cancer cell lines, although RAW 264.7 cells were more sensitive.

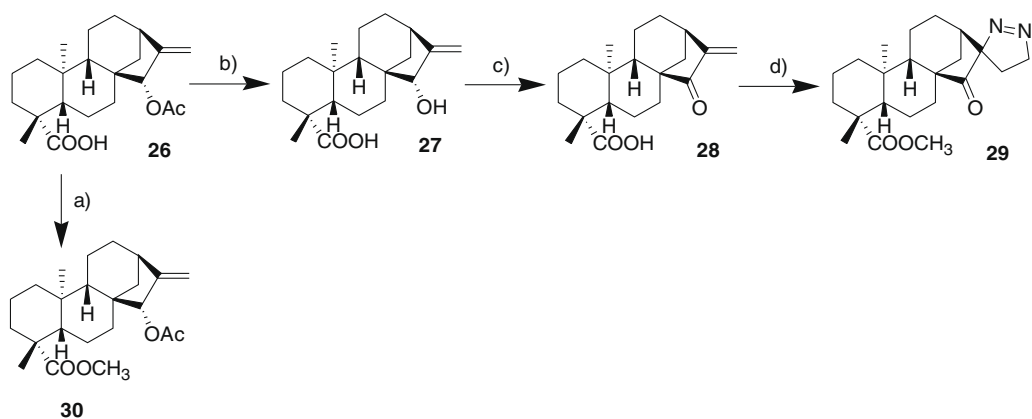
In order to verify the selectivity of these compounds on cancer cell lines, we examine their effects on non-tumor cells. Primary cultures of peritoneal macrophages obtained from thioglycolate-injected mice were stimulated for 24 h with a range of concentrations of compounds **12**, **20**, **21**, and **23** and apoptosis and cell viability were determined (Fig. 2). Only compound **20** affected cell viability and induced apoptosis in peritoneal macrophages, whereas compounds **12**, **21**, and **23** were not cytotoxic for peritoneal macrophages. These data thus suggest that *ent*-kaurane derivatives induce apoptosis in various cancer cell lines but are significantly less cytotoxic in non-transformed cells, providing evidence for the potential use of these compounds as antitumor agents.

From the obtained results some structure–activity relationships can be established. Concerning the functionalization at

C-4 of the ring A, the best results were achieved with compounds having an ester group. The hydroxyl derivatives **9** and **25** obtained from the reduction of the corresponding carboxylic function were inactive. The esterification of the parent carboxylic acids led to an increase in the activity (i.e., **12** vs **28**, **1** vs **8**, **1** vs **2**). These results indicated that a hydrogen-bond-donor (HBD) group at ring A was not an important requirement for the inhibitory activity which is favoured by the increase of lipophilicity. The role of the double bond at C-9–C-11 of the ring C is not too clear. Depending on the type of substituents at the ring D, this double bond increases or decreases the activity. When the exocyclic double bond C-16–C-17 is only present in the ring D, the activity is increased with the additional double bond C-9–C-11 (e.g., compare the activity of **1** vs **16**, **2** vs **17**, and **9** vs **25**). If an oxygenated function is present at C-15 or at C-16 the more active compounds are those that do not have the double bond at ring C (e.g., compare the activity of **14** vs **18**, **12** vs **23**, and **8** vs **24**) while compound **20** having an aldehyde group at C-17 and the C-9–C-11 double bond was more



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a)  $\text{CH}_2\text{N}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 24 h; (b)  $\text{OsO}_4$ , NMO,  $t\text{BuOH/THF/H}_2\text{O}$  7:2:1, 23 h; (c)  $\text{SeO}_2$ , DCM, 17 h; (d) PDC, DCM, 24 h; (e)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , py, DMAP, 24 h; (f)  $\text{BnBr}$ , acetone, 6 h; (g)  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 3 h.

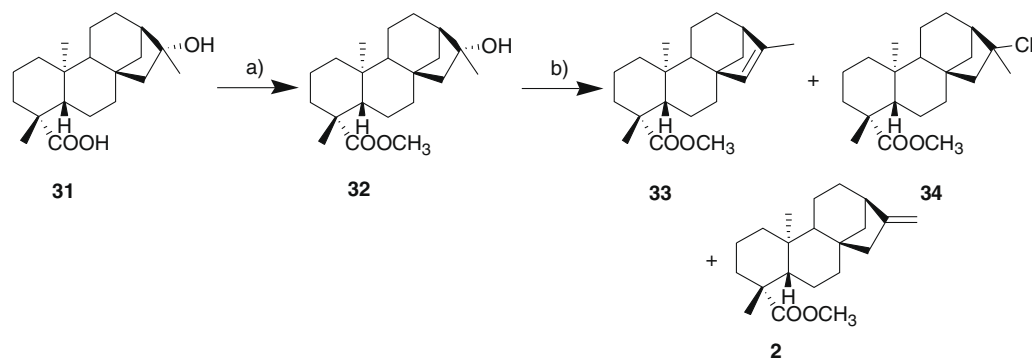


**Scheme 3.** Reagents and conditions: (a)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M, MeOH, 24 h; (b) Jones reagent, acetone,  $0^\circ\text{C}$ , 6 h; (c)  $\text{CH}_2\text{N}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 5 h; (d)  $\text{CH}_2\text{N}_2$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 17 h.

active than compound **11**, without the mentioned double bond. In order to evaluate the influence on the activity of substituents of different nature in the cyclopentane ring D, we carried out several modifications. The best activities were obtained with those compounds having a  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl group (compounds **12**, **20**, and **23**). The replacement of the carbonyl group of compounds **19**, **22**, **26**, **27**, and **30** led to a loss of activity. When the double bond of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety was modified, the proliferative activity decreased (e.g., compare the activity of **12** vs **29**, **12** vs **13**, and **11** vs **6**). These results highlighted the importance of this moiety, probably acting as a Michael acceptor with

nucleophilic residues present in the target. This conclusion is in agreement with the results found for other kaurenoic derivatives from Asian species belonging to the *Isodon* genus (Labiateae) and containing an  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone moiety at the D ring. These compounds are poly-hydroxylated and most of them have been found to be cytotoxic against several cancer cell lines.<sup>21</sup> The active compound **21** presents a different skeleton, because of it was formed through an oxidative rearrangement from **17**. The cyclopentane ring in compound **21** is formed by a bridge between C-11 and C-13 instead of between C-8 and C-13. We have not found similar structures described previously in the chemical literature.<sup>22</sup>





**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a)  $\text{Me}_3\text{SiCHN}_2$ , MeOH,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 15 h; (b)  $\text{SOCl}_2$ , DCM, reflux, 3 h.

**Table 1**

$\text{IC}_{50}$  values<sup>a</sup> ( $\mu\text{M}$ ) of compounds **1–34** in cell viability

Compound	RAW 264.7	Hela	HepG2	HT-29
<b>1</b>	>100	—	—	—
<b>2</b>	$75 \pm 2.3$	—	—	—
<b>3</b>	$75 \pm 7.6$	—	—	—
<b>4</b>	>100	—	—	—
<b>5</b>	>100	—	—	—
<b>6</b>	>100	—	—	—
<b>7</b>	$35 \pm 5.2^*$	—	—	—
<b>8</b>	$25 \pm 2.1^*$	—	—	—
<b>9</b>	>100	—	—	—
<b>10</b>	>100	—	—	—
<b>11</b>	$25 \pm 4.3^*$	—	—	—
<b>12</b>	$1 \pm 0.2^{***}$	$50 \pm 6.3^*$	$75 \pm 8.3^*$	$30 \pm 2.7^*$
<b>13</b>	>100	—	—	—
<b>14</b>	$10 \pm 0.5^{**}$	—	—	—
<b>15</b>	>100	—	—	—
<b>16</b>	$15 \pm 1.3^{**}$	—	—	—
<b>17</b>	$35 \pm 4.3^*$	—	—	—
<b>18</b>	$25 \pm 3.7^*$	—	—	—
<b>19</b>	>100	—	—	—
<b>20</b>	$5 \pm 0.4^{**}$	$10 \pm 1.4^*$	$25 \pm 3.3^*$	$40 \pm 4.5^*$
<b>21</b>	$5 \pm 0.3^{**}$	>100	>100	>100
<b>22</b>	$35 \pm 3.6^*$	—	—	—
<b>23</b>	$5 \pm 0.7^{**}$	$25 \pm 1.2^*$	>100	$25 \pm 2.7^*$
<b>24</b>	$65 \pm 2.0^*$	—	—	—
<b>25</b>	$35 \pm 1.5^*$	—	—	—
<b>26</b>	$25 \pm 0.3^*$	—	—	—
<b>27</b>	>100	—	—	—
<b>28</b>	$35 \pm 1.9^*$	—	—	—
<b>29</b>	100	—	—	—
<b>30</b>	$25 \pm 4.3^*$	—	—	—
<b>31</b>	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested
<b>32</b>	$25 \pm 0.9^*$	—	—	—
<b>33</b>	100	—	—	—
<b>34</b>	>100	—	—	—

<sup>a</sup>  $\text{IC}_{50}$  values refer to the concentration needed to inhibit 50% of cell viability in the presence of the compounds. RAW 264.7 cells were treated with different concentrations of derivatives (1–100  $\mu\text{M}$ ) for 24 h and Hela, HepG2, and HT-29 cells were treated with different concentrations of derivatives **12**, **20**, **21**, and **23** (1–100  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. The effects on cell viability of the compounds are reported as  $\text{IC}_{50}$  values ( $\mu\text{M}$ ) determined using the MTT assay. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P > 0.001$  with respect to the non-treated cells.

### 2.2.2. Induction of apoptosis in RAW 264.7 cells

Many anticancer drugs induce apoptosis. To investigate the apoptotic potential of these compounds, the mouse leukemic macrophagic RAW 264.7 cell line was treated for 24 h with compounds over a concentration range from 1 to 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 3A) and apoptotic cells detected by flow cytometry. All compounds were able to induce apoptosis; although the most effective compound was compound **12** which induced apoptosis in 50% of cells at 1  $\mu\text{M}$ . Apoptotic cells undergo characteristic morphological changes that depend on a cascade of proteolytic enzymes called caspases.

Caspase 8 is the main executor of the extrinsic pathway initiated at the plasma membrane by activation of cell surface death receptors, whereas caspase 9 is activated in the intrinsic pathway mediated by mitochondria. In addition, both caspases activate downstream apoptotic effectors such as caspase 3. To analyze caspase activation, we used the fluorogenic peptide substrates, Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AFC, and Ac-LEHD-AFC specific for caspase-3, -8, and -9, respectively. Caspase activities were measured following treatment of cells with 5  $\mu\text{M}$  of compound for 24 h (Fig. 3B). Treatment with compounds **12**, **21**, and **23** increased the enzymatic activities of caspases 8, 9, and 3, whereas compound **20** only activated caspases 9 and 3. Both caspase activity and apoptosis were efficiently inhibited after treatment with the general caspase inhibitor z-VAD (Fig. 3B and C). These data demonstrate that compounds **12**, **21**, and **23** induce apoptosis via the activation of caspase 8, which can also activate the intrinsic pathway, whereas in compound **20**-dependent apoptosis, mitochondria seems to play a key role.

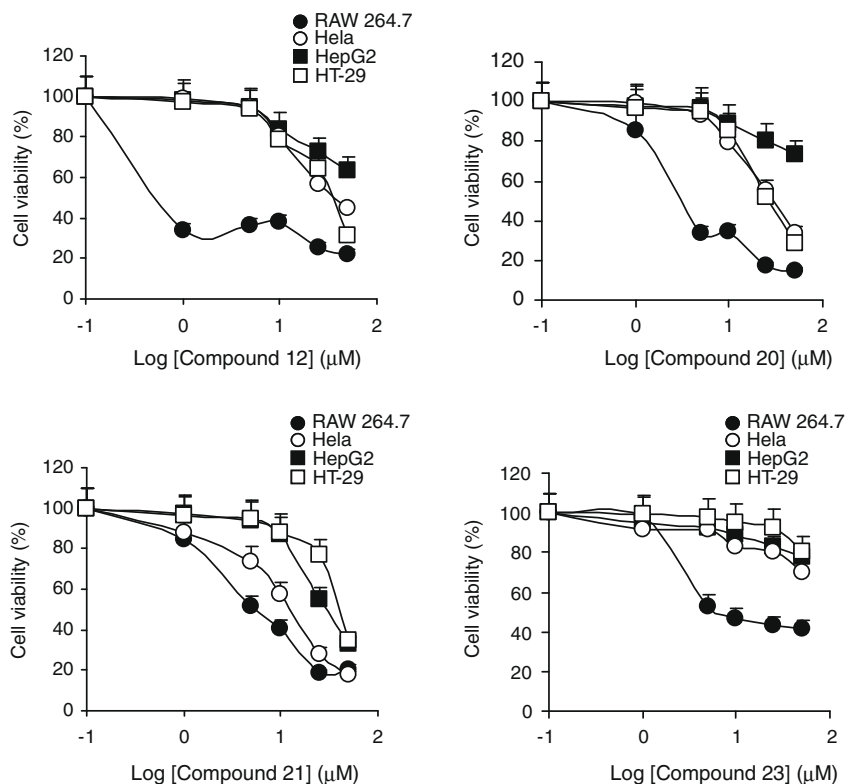
An analysis of the structures of compounds **12**, **20**, **21**, and **23** indicates that compounds that activate caspase 9 present an accessible exocyclic double bond which probably efficiently binds some residues present in caspase-9. Compound **20** does not have the mentioned exocyclic double bond, it presents an aldehyde group conjugated with a trisubstituted endocyclic double bond which may interact better with other residues present in caspase 9.

### 2.2.3. Gene expression during apoptosis

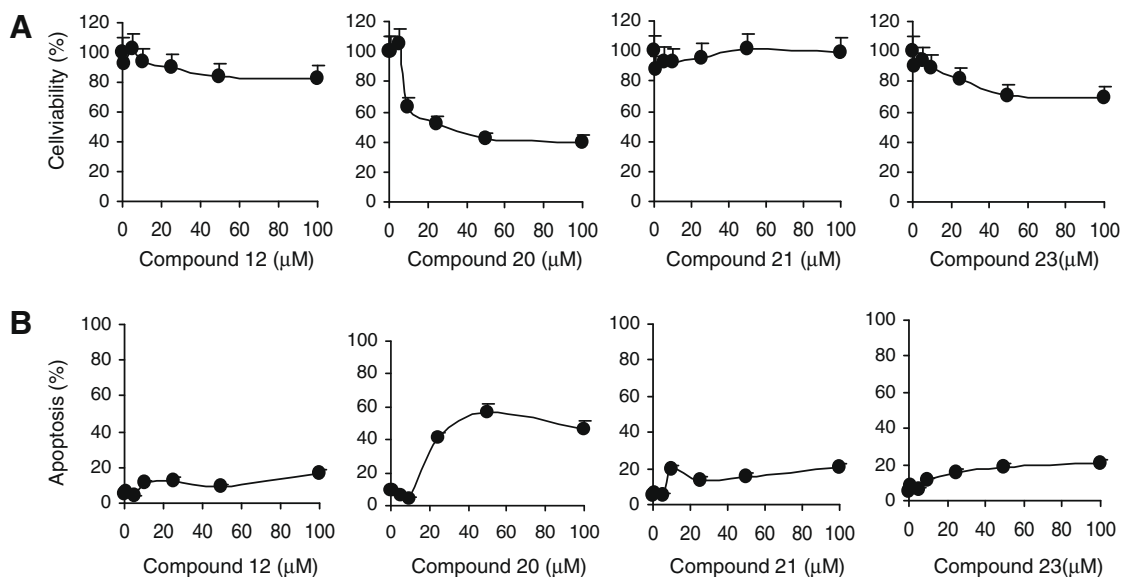
Several gene products are known to be important in controlling the apoptotic process. To determine whether our compounds have an effect on the expression levels of these gene products, cells were incubated with 5  $\mu\text{M}$  of the kaurane derivatives (**12**, **20**, **21**, and **23**) and cellular lysates were analyzed by Western blotting. These Western blots were probed with antibodies against p53, Bcl-2, Bax, Bcl-xl, XIAP, IAP-1, and IAP-2 proteins (Fig. 4). When cells were exposed to 5  $\mu\text{M}$  of the different compounds, expression levels of p53 and Bax increased whereas levels of antiapoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-xl, and IAPs decreased. These results are very interesting due to the fact that an important area of future research is the identification of the genes that are involved in the apoptotic program of cell death. For example, the ratio between Bcl-2 and Bax determines cell survival or death. In our study, we found that the expression of the Bcl-2 and Bcl-xl decreased, whereas the amount of Bax protein increased under the same conditions.

## 3. Conclusion

Apoptosis has been recognized as a tightly controlled mechanism involving death factors and death receptors in the control of cell proliferation. Induction of apoptosis in cancer cells or malig-



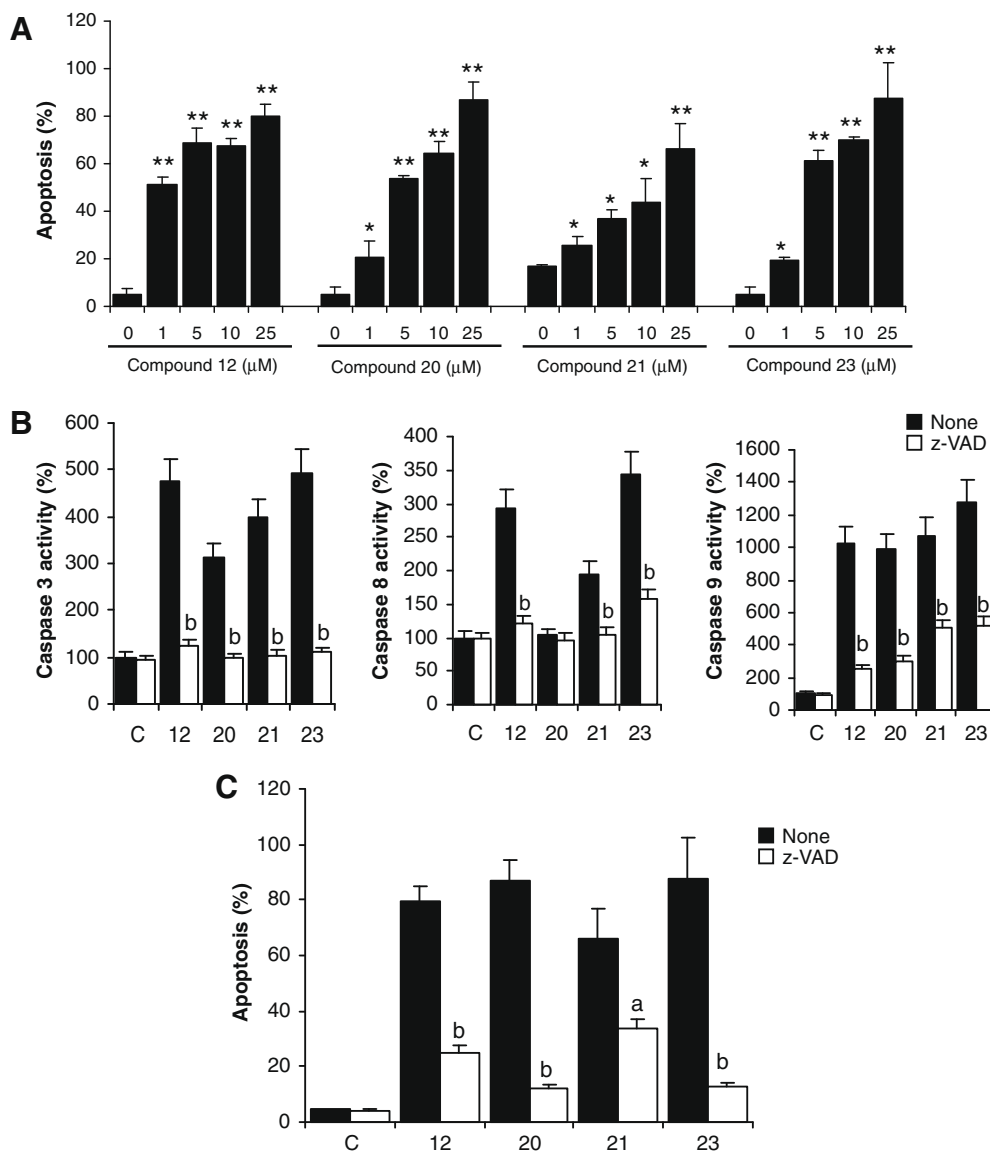
**Figure 1.** Cell viability on tumor cells. RAW 264.7, HeLa, HepG2, and HT-29 cells were treated with different concentrations (1–50 μM) of compounds for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay, and results are reported as mean of cell viability (%) of at least three replicate wells  $\pm$  SD. Results are normalized to cell viability of non-treated cells at 24 h.



**Figure 2.** Effects of *ent*-kauranes on non-tumor cells. (A) Peritoneal macrophages (PM) isolated from thioglycolate-injected mice were treated with the indicated concentrations of compounds for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. (B) PM were treated with the indicated concentrations of compounds for 24 h. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry after staining with PI. Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments carried out in duplicate.

nant tissues is recognized as an efficient strategy for cancer chemotherapy. Natural products have been the source of many medically beneficial drugs, and their importance in the prevention and treatment of cancer is becoming increasingly apparent. In this work, a set of *ent*-kaurane derivatives were synthesized with the aim of identifying the structural requirements to achieve good activity and to establish structure–activity relationships. The biological

activities of the obtained kaurane derivatives were focused on apoptotic activity and revealed that compounds **12**, **20**, **21**, and **23** act as apoptosis inducers. These compounds exhibited growth inhibition and cytotoxicity in different cancer cells. Of particular interest in this regard is our finding that these compounds have a stronger proapoptotic action on tumor cells whereas no cytotoxic effects were observed for compounds **12**, **21**, and **23** in peritoneal



**Figure 3.** Induction of apoptosis and caspase activation. (A) Cells were treated with different concentrations of compounds (1–25  $\mu$ M) for 24 h. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI). (B) Caspase activities were fluorimetrically determined in cell extracts after treatment of RAW cells with compounds (5  $\mu$ M) in the presence or absence of z-VAD (40  $\mu$ M). (C) Cells were treated with compounds (5  $\mu$ M) in the presence or absence of z-VAD (40  $\mu$ M) for 24 h. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI). Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments carried out in triplicate. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 with respect to the control condition and  $a$  < 0.05 and  $b$  < 0.01 with respect to the cells incubated in absence of z-VAD.

macrophages. This selective apoptosis of transformed cells requires further study, but might indicate a greater resistance of normal cells to apoptosis than tumor cells, and suggests a promising future for these compounds as therapeutic agents.

*ent*-Kaurane derivatives-induced apoptosis was characterized by the activation of caspase-3, -8, and -9. Exposure of cells to *ent*-kaurane derivatives resulted in up-regulation of Bcl-2-associated protein (Bax) and down-regulation of the expression of the survival protein Bcl-2 and Bcl-xl.

The presence of a  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl moiety seems to play an important role in the activity since it is present in three of the four apoptosis inducers, and replacement of the carbonyl group of compounds **12**, **20**, and **23** by a different group (hydroxy or acetoxy) resulted in the loss of activity. This moiety could act as Michael acceptor with nucleophilic residues, especially cysteine sulfhydryl groups.<sup>23</sup>

In short, we believe that the findings presented here demonstrate that *ent*-kaurane derivatives are potent inducers of apoptosis

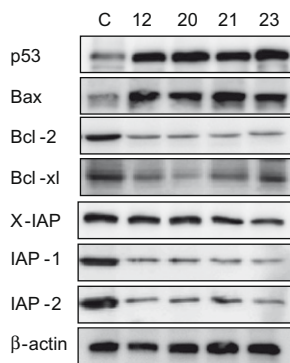
in tumor cells and will provide a basis for constructing new chemotherapeutic agents for the treatment or clinical management of some types of human cancers. Thus, further investigation of *ent*-kaurane derivatives will contribute to additional understanding of their in vitro activity toward malignant cells and their potential toxicity toward normal tissues.

## 4. Experimental

### 4.1. Chemistry

#### 4.1.1. General

All solvents and reagents were purified by standard techniques reported in Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed.; Pergamon Press: Oxford, 1988 or used as supplied from commercial sources as appropriate. Reactions were monitored by TLC (on silica gel POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> foils). Purification by column flash-chromatography used Merck Kiesel 60-H



**Figure 4.** Immunoblot analysis of the expression of p53, Bax, Bcl-2, Bcl-xl, and IAPs in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated with compounds (5  $\mu$ M) and the expression of the apoptosis-related proteins p53, Bax, Bcl-2, Bcl-xl, X-IAP, IAP-1, and IAP-2 was determined at the indicated times by Western blot in cytosolic extracts. Protein loading was normalized to the expression of  $\beta$ -actin. A representative experiment is shown of three performed.

(0.063–0.2 mm) as adsorbent and different mixtures of hexanes–ethyl acetate as eluent. Pre-coated TLC plates SIL G-100 UV<sub>254</sub> (Machery-Nagel) were used for preparative-TLC purification.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded in  $\text{CDCl}_3$  or  $\text{C}_6\text{D}_6$  at 300 or 400 MHz, using a Bruker AMX300 or Bruker AMX400 instruments. For  $^1\text{H}$  spectra, chemical shifts are given in parts per million (ppm) and are referenced to the residual solvent peak. The following abbreviations are used: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad. Proton assignments and stereochemistry are supported by  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  COSY and ROESY where necessary. Data are reported in the following manner: chemical shift (multiplicity, coupling constant if appropriate, integration). Coupling constants ( $J$ ) are given in hertz (Hz) to the nearest 0.5 Hz.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded at 75 and 100 MHz using a Bruker AMX300 or Bruker AMX400 instruments. Carbon spectra assignments are supported by DEPT-135 spectra,  $^{13}\text{C}$ – $^1\text{H}$  (HMQC) and  $^{13}\text{C}$ – $^1\text{H}$  (HMBC) correlations were necessary. Chemical shifts are quoted in ppm and are referenced to the appropriate residual solvent peak. MS and HRMS were recorded on a VG Micromass ZAB-2F. IR spectra were taken on a Bruker IFS28/55 spectrophotometer. Kaurenoic acid (**1**), grandiflorenic acid (**16**),  $15\alpha$ -acetoxy-kaurenoic acid (**26**), and  $16\alpha$ -hydroxy-kaurenoic acid (**31**) were used as starting material to synthesize the diterpenes. These diterpenes were isolated from *Espeletia chardonii* using the habitual previously described methodology.<sup>20</sup>

#### 4.1.2. Kaurenoic acid methyl ester (**2**)

292.8 mg (0.970 mmol) of kaurenoic acid dissolved in 10 mL of ethyl ether were treated with 1 mL of solution of  $\text{CH}_2\text{N}_2$  in  $\text{Et}_2\text{O}$ . The reaction mixture was left at room temperature until the disappearance of the starting material. After elimination of solvent a white residue was obtained (305.0 mg, 100%), which showed identical spectroscopic data to those of kaurenoic acid methyl ester (**2**).<sup>24</sup>

#### 4.1.3. Dihydro kaurenoic acid methyl ester (**3**)

23.5 mg (0.074 mmol) of compound **2** dissolved in 4 mL of dry THF were hydrogenated in the presence of catalytic amount of Pd/C 10%. The reaction mixture was stirred for 24 h until disappearance of the starting material. After elimination of solvent the resulting residue was purified by preparative-TLC using Hex/AcOEt (3:2) to yield 8.7 mg of compound **3** (37%) as white amorphous solid. Compound **3** showed identical spectroscopic data to those of dihydro kaurenoic acid methyl ester.<sup>25</sup>

#### 4.1.4. Preparation of epoxy derivatives (**4**) and (**5**)

To 346.8 mg (1.097 mmol) of compound **2** dissolved in DCM (12 mL) were added 324.5 mg of 70% AMCPB (1.2 equiv) and 405 mg of  $\text{NaHCO}_3$  (4.4 equiv). The reaction mixture was left to room temperature for 25 min, then the organic phase was separated and treated with a saturated solution of sodium thiosulfate. The organic phase was separated again and dried over anhydrous magnesium sulfate, the mixture was filtered, the solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by chromatotron using Hex/AcOEt 5% to yield 41.4 mg of **4** (11%) and 240.7 mg of **5** (66%) as yellow oils. Compounds **4** and **5** showed spectroscopic data identical to those reported.<sup>26</sup>

#### 4.1.5. Preparation of the aldehyde (**6**)

75.4 mg (0.227 mmol) of epoxy derivative **5** dissolved in 5 mL of dry THF under nitrogen atmosphere were treated with 0.27 mL of  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  (9.4 equiv). The reaction was followed by TLC and when the starting material disappeared the solvent was removed, the residue was redissolved in ethyl acetate and treated with saturated solution of NaCl. The organic phase was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated to afford 75.4 mg of compound **6** as pale yellow oil (100%). This compound resulted be highly unstable.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.64 (1H, d,  $J$  = 1.89 Hz, H-17), 3.63 (3H, s, H-21), 2.59 (1H, t,  $J$  = 7.5 Hz, H-16), 2.53 (1H, s, H-13), 2.16 (1H, d,  $J$  = 13 Hz, H-15a), 1.16 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, s, H-20), 2.05–0.85 (19H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 203.8 (d, C-17), 177.9 (s, C-19), 56.7 (d, C-5), 54.9 (d, C-9), 53.4 (d, C-16), 51.0 (q, C-21), 44.9 (s, C-8), 43.5 (s, C-4), 40.8 (t, C-7), 40.5 (t, C-1), 39.9 (t, C-15), 39.2 (s, C-10), 37.8 (t, C-3), 37.5 (t, C-14), 37.5 (d, C-13), 30.7 (t, C-12), 28.5 (q, C-18), 22.2 (t, C-6), 18.9 (t, C-2), 18.5 (t, C-11), 15.1 (q, C-20).

#### 4.1.6. Preparation of the oxime derivative (**7**)

To a solution of hydroxylamine hydrochloride (7.2 mg, 3 equiv) and sodium acetate (5.7 mg, 1.7 equiv) in 0.4 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ , 11.5 mg of aldehyde **6** in 3 mL of EtOH was added. The reaction mixture was stirred under reflux for 16 h. Then the EtOH was removed, and the residue was extracted with DCM ( $3 \times 10$  mL). The organic phases were collected and dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , then were filtered and concentrated. The residue was purified by preparative-TLC using *n*-Hex/AcOEt (4:1) and 4.4 mg of **7** (37%) were obtained as a yellow oil in a *E:Z* ratio of 1.5:1.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.37 (1H, d,  $J$  = 7.1 Hz, H-17E), 6.67 (1H, d,  $J$  = 6.9 Hz, H-17Z), 3.64 (3H, s, H-21), 1.16 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, s, H-20), 3.18–0.85 (23H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 177.9 (s, C-19), 156.7 (d, C-17), 56.7 (d, C-5), 54.9 (d, C-9), 50.9 (q, C-21), 45.2 (d, C-16), 45.1 (s, C-8), 43.5 (s, C-4), 40.6 (t, C-7), 40.5 (t, C-1), 40.5 (t, C-15), 39.1 (s, C-10), 37.8 (t, C-3), 37.4 (d, C-13), 30.6 (t, C-14), 29.5 (t, C-12), 28.5 (q, C-18), 22.2 (t, C-6), 18.9 (t, C-2), 18.4 (t, C-11), 15.1 (q, C-20). EIMS  $m/z$  (%): 347 ( $[\text{M}]^+$ , 23), 330 (44), 288 (72), 276 (48), 270 (100), 149 (28), 131 (21), 123 (45), 121 (37), 119 (25), 109 (53), 107 (39), 101 (21), 97 (20), 95 (34), 93 (30), 91 (32), 83 (31), 81 (44), 79 (32), 72 (34), 71 (30), 69 (68). HREIMS: 347.2451 (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_3$   $[\text{M}]^+$  347.2460). IR  $\nu_{\text{max}}$  3276, 2928, 2853, 1726, 1459, 1233, 1150, 771  $\text{cm}^{-1}$ . UV( $\text{CHCl}_3$ )  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 202.2 (3.42) nm.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  –83.41 (c 0.4,  $\text{CHCl}_3$ ).

#### 4.1.7. Kaurenoic acid benzyl ester (**8**)

100 mg (0.331 mmol) of kaurenoic acid (**1**) and 82  $\mu$ L of benzyl bromide (1 equiv) were added to a solution of 74.7 mg of KOH (4 equiv) in 5 mL of dry acetone (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h. Then, 40 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  were poured and the mixture was extracted with AcOEt. The combined organic extracts were washed with brine and dried over  $\text{MgSO}_4$ . After removal of solvent the residue was purified by flash chromatography using *n*-Hex/AcOEt 5% to afford 54.3 mg of compound **8**

(54%) as an amorphous white solid.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.35 (5H, m, H-23, 24, 25, 26, 27), 5.14 (1H, d,  $J = 12.5$  Hz, H-21a), 5.03 (1H, d,  $J = 12.5$  Hz, H-21b), 4.79 (1H, s, H-17a), 4.73 (1H, s, H-17b), 2.62 (1H, s, H-13), 1.20 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-20), 2.23–0.83 (20H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 177.1 (s, C-19), 155.6 (s, C-16), 136.0 (s, C-22), 128.8 (d, C-25), 128.6 (d, C-24), 128.2 (s, C-26), 128.0 (s, C-23), 127.8 (d, C-27), 102.8 (t, C-17), 65.7 (t, C-21), 57.0 (d, C-5), 54.8 (d, C-9), 48.7 (t, C-15), 44.0 (s, C-8), 43.7 (s, C-4), 43.6 (d, C-13), 41.1 (t, C-7), 40.5 (t, C-1), 39.3 (t, C-14), 39.3 (s, C-10), 37.9 (t, C-3), 32.9 (t, C-12), 28.7 (q, C-18), 21.7 (t, C-6), 19.0 (t, C-2), 18.2 (t, C-11), 15.4 (q, C-20). EIMS  $m/z$  (%): 392 ( $[\text{M}]^+$ , 41), 301 (27), 255 (11), 147 (9), 133 (9), 123 (10), 105 (12), 93 (12), 91 (100), 81 (16), 79 (11), 55 (11). HREIMS: 392.2706 (calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_2$   $[\text{M}]^+$  392.2715). IR  $\nu_{\text{max}}$  3064, 2930, 2853, 1723, 1652, 1540, 1458, 1228, 1144, 873, 735, 671  $\text{cm}^{-1}$ . UV(EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 203.8 (3.71) nm.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -83.42$  (c 0.8,  $\text{CHCl}_3$ ).

#### 4.1.8. Preparation of compound 9

To a solution of 100 mg of **1** (0.331 mmol) in 25 mL of  $\text{Et}_2\text{O}$  were slowly added 30 mg of  $\text{LiAlH}_4$  (2.4 equiv). The reaction mixture was left under stirring at room temperature for 3 h, then it was treated with a saturated solution of ammonium sulfate. The mixture was filtered through Celite, the aqueous phase was several times extracted with AcOEt. The combined organic extracts were dried over  $\text{MgSO}_4$  and after removal of solvent 27 mg (28%) of **9** were obtained. Compound **9** showed identical spectroscopic data to those reported.<sup>27</sup>

#### 4.1.9. Preparation of compounds 10 and 11

To 46.8 mg of methyl ester kaurenoic acid (**2**) in 2.6 mL of dry DCM under  $\text{N}_2$  atmosphere were added 20.6 mg of  $\text{SeO}_2$  (1.2 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h until disappearance of the starting material. After removal of solvent the residue was redissolved in AcOEt, treated with brine and the aqueous phase extracted several times with AcOEt. The combined organic extracts were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated. The residue was purified by preparative-TLC using *n*-Hex/AcOEt (4:1) to obtain 18.5 mg of compound **10** (38%) and 5.6 mg of compound **11** (11%) as amorphous yellow solids. Compound **10**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.20 (1H, s, H-17a), 5.07 (1H, s, H-17b), 3.80 (1H, s, H-15), 3.64 (3H, s, H-21), 2.74 (1H, s, H-13), 1.18 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-20), 1.94–0.76 (19H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 177.9 (s, C-19), 160.1 (s, C-16), 108.1 (t, C-17), 82.4 (d, C-15), 56.7 (d, C-5), 53.1 (d, C-9), 50.9 (q, C-21), 47.5 (s, C-8), 43.6 (s, C-4), 42.0 (d, C-13), 40.5 (t, C-1), 39.3 (s, C-10), 37.8 (t, C-3), 35.9 (t, C-7), 35.0 (t, C-14), 32.3 (t, C-12), 28.5 (q, C-18), 20.8 (t, C-6), 18.9 (t, C-2), 18.0 (t, C-11), 15.4 (q, C-20). EIMS  $m/z$  (%): 332 ( $[\text{M}]^+$ , 55), 317 (31), 314 (49), 299 (51), 274 (70), 273 (47), 272 (38), 257 (58), 255 (100), 249 (32), 239 (51), 199 (22), 189 (37), 173 (29), 164 (28), 159 (30), 150 (32), 147 (36), 145 (29), 137 (26), 135 (40), 133 (38), 123 (70), 121 (90), 119 (30), 117 (29), 109 (85), 107 (76), 105 (58). HREIMS: 332.2349 (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$  332.2351). IR  $\nu_{\text{max}}$  3501, 2933, 2855, 1725, 1463, 1234, 1192, 1154, 1000, 755  $\text{cm}^{-1}$ . UV(EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 202.0 (3.43) nm.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -92.00$  (c 0.5,  $\text{CHCl}_3$ ). Compound **11**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.71 (1H, s, H-17), 6.57 (1H, s, H-15), 3.63 (3H, s, H-21), 3.01 (1H, m, H-13), 1.16 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-20), 2.18–0.74 (18H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 189.2 (d, C-17), 177.5 (s, C-19), 161.4 (d, C-15), 148.3 (s, C-16), 56.3 (d, C-5), 51.0 (q, C-21), 50.7 (s, C-8), 45.6 (d, C-9), 43.5 (s, C-4), 42.7 (t, C-7), 40.4 (t, C-1), 39.6 (s, C-10), 37.9 (t, C-14), 37.7 (t, C-3), 37.5 (d, C-13), 28.5 (q, C-18), 24.8 (t, C-12), 20.1 (t, C-6), 18.8 (t, C-2), 18.4 (t, C-11), 15.1 (q, C-20). EIMS  $m/z$  (%): 330 ( $[\text{M}]^+$ , 100), 315 (32), 271 (77), 270 (62), 255 (31), 253 (21), 237 (20), 175 (25), 163 (57), 162 (28), 149 (26), 147 (24), 135 (22), 133 (30), 123 (78), 121 (56), 109 (69), 107 (57), 101 (27), 95

(36), 93 (37), 91 (73), 81 (54), 79 (54), 77 (32), 67 (40), 55 (55). HREIMS: 330.2185 (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$  330.2195). IR  $\nu_{\text{max}}$  2937, 2852, 2703, 1724, 1676, 1603, 1447, 1232, 1158, 987, 709  $\text{cm}^{-1}$ . UV(EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 200.6 (3.30) and 251.8 (3.53) nm.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -97.09$  (c 0.8,  $\text{CHCl}_3$ ).

#### 4.1.10. Preparation of the $\alpha,\beta$ -unsaturated ketone **12** from compound **10**

To 74.4 mg (0.224 mmol) of compound **12** in 2.5 mL of dry DCM were added 150.1 mg of PDC (1.9 equiv) dissolved in 0.55 mL of DCM. The reaction mixture was stirred for 24 h, then it was filtered through florisil and the solvent removed. The residue was purified by flash chromatography using *n*-Hex/AcOEt 10% to yield 47.7 mg of **12** (65%) as amorphous white solid. Compound **12** showed identical spectroscopic data to those reported.<sup>28</sup>

#### 4.1.11. Preparation of derivative **13**

22.8 mg of  $\alpha,\beta$ -unsaturated-ketone **12** in 20 mL of toluene were treated with 40  $\mu\text{L}$  of ethyl vinyl ether (6 equiv) in a sealed tube at 100 °C for 70 h. Then the solvent was removed and the crude was purified by preparative-TLC using *n*-Hex/AcOEt (12%) to yield 6.7 mg of compound **13** (23%) as yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.21 (5H, m, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7'), 3.64 (3H, s, H-21), 2.74 (2H, m, H-16, H-1'a), 2.49 (1H, s, H-13), 2.41 (1H, d,  $J = 12$  Hz, H-1'b), 1.17 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, s, H-20) 2.39–0.78 (18H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 223.8 (s, C-15), 177.6 (s, C-19), 141.6 (s, C-2'), 130.1 (d, C-4', C-6'), 128.1 (d, C-3', C-7'), 125.6 (d, C-5'), 55.8 (d, C-16), 53.3 (s, C-8), 52.7 (d, C-5), 51.2 (d, C-9), 51.0 (q, C-21), 43.5 (s, C-4), 39.5 (s, C-10), 39.4 (t, C-1), 37.7 (t, C-3), 36.9 (t, C-1'), 34.1 (t, C-7), 33.9 (t, C-14), 32.8 (d, C-13), 28.5 (q, C-18), 27.2 (t, C-17), 24.5 (t, C-12), 20.1 (t, C-6), 18.6 (t, C-2), 18.2 (t, C-11), 15.0 (q, C-20). EIMS  $m/z$  (%): 422 ( $[\text{M}]^+$ , 43), 409 (30), 408 (100), 319 (21), 318 (55), 275 (32), 274 (95), 215 (21), 215 (20), 131 (20), 121 (50), 107 (37), 105 (25), 93 (25), 91 (97). HREIMS: 422.2801 (calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$  422.2821). IR  $\nu_{\text{max}}$  2928, 2859, 1726, 1454, 1231, 1156, 699  $\text{cm}^{-1}$ . UV(EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 204.2 (3.62).  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -87.46$  (c 0.7,  $\text{CHCl}_3$ ).

#### 4.1.12. Preparation of compound **14**

To 40.8 mg of compound **2** (0.129 mmol) dissolved in a mixture of  $\text{tBuOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  (7:2:1) was added 2 mg of  $\text{OsO}_4$  (6 mol %) and 49.6 mg of NMO (3.3 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature until disappearance of the starting material, then it was treated with a saturated solution of  $\text{NaHSO}_3$  and extracted several times with AcOEt. The combined organic layers were successively washed with saturated solution of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  and brine. Then the organic extracts were dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated to yield 44.2 mg (98%) of **14** as an amorphous white solid. Compound **14** showed spectroscopic data identical to those reported.<sup>29</sup>

#### 4.1.13. Grandiflorenic acid methyl ester (**17**)

Following the same experimental procedure for compound **2**, the methyl ester **17** was obtained quantitatively from **16**, and it showed spectroscopical data identical to those reported.<sup>30</sup>

#### 4.1.14. Preparation of compound **18**

Following the same experimental procedure for compound **14**, 247.6 mg of compound **17** (0.789 mmol) dissolved in 5 mL of  $\text{tBuOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  (7:2:1) were treated with 5 mg of  $\text{OsO}_4$  and 304.45 mg of NMO (3.3 equiv). The reaction mixture was stirred for 24 h, and it was quenched with 8 mL of saturated solution of  $\text{NaHSO}_3$ . After the same treatment describe for **14**, 243.7 mg of **18** were obtained (89%). **18** showed identical spectroscopic data to those published in reference 31.<sup>31</sup>



#### 4.1.15. Preparation of compounds 19–21

To 277.2 mg of compound **17** (0.883 mmol) dissolved in 12 mL of dry DCM under N<sub>2</sub> atmosphere were added 250.8 mg of SeO<sub>2</sub> (2.6 equiv) and the mixture was stirred for 17 h at room temperature. Then the mixture was treated following the same procedure for compounds **10** and **11**. The crude was purified by chromatotron using 2 mm plate and *n*-Hex/AcOEt 10% as solvent to yield 152.2 mg of **19** (53%), 23.2 mg of **20** (8%), and 16.0 mg of **21** (6%) as amorphous solids. Compound **19** showed identical spectroscopic data to those reported.<sup>32</sup>

Compound **20** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.58 (1H, s, H-17), 7.06 (1H, s, H-15), 5.13 (1H, s, H-11), 3.65 (3H, s, H-21), 3.14 (1H, s, H-13), 1.21 (3H, s, H-18), 0.95 (3H, s, H-20), 2.50–0.77 (15H, m). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 189.4 (d, C-17), 177.3 (s, C-19), 160.4 (d, C-15), 153.9 (s, C-16), 145.4 (s, C-9), 116.4 (d, C-11), 51.2 (q, C-21), 47.6 (d, C-5), 47.5 (t, C-14), 47.3 (s, C-4), 44.8 (s, C-8), 39.8 (t, C-1), 38.0 (t, C-3), 37.9 (s, C-10), 34.9 (d, C-13), 28.0 (q, C-18), 27.8 (t, C-12), 25.9 (t, C-7), 22.8 (q, C-20), 19.8 (t, C-2), 18.1 (t, C-6). EIMS *m/z* (%): 328 ([M]<sup>+</sup>, 45), 269 (29), 253 (81), 235 (25), 234 (100), 202 (19), 197 (23), 187 (21), 175 (37), 174 (69), 173 (21), 159 (80), 147 (39), 145 (22), 129 (24), 121 (27), 117 (26), 107 (28), 105 (40), 93 (20), 91 (50). HREIMS: 328.2039 (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup> 328.2038). IR ν<sub>max</sub> 2942, 2871, 1723, 1672, 1459, 1218, 1145, 981, 706 cm<sup>-1</sup>; UV(EtOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 202.2 (3.55) and 251.0 (3.47) nm. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +61.26 (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>). Compound **21** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.19 (1H, s, H-17a), 5.17 (1H, s, H-17b), 4.22 (1H, s, H-15), 3.62 (3H, s, H-21), 2.80 (1H, s, H-13), 2.42 (1H, d, *J* = 4.1 Hz, H-11), 2.26 (1H, d, *J* = 4.6 Hz, H-14a), 2.22 (1H, m, H-3a), 2.07 (1H, m, H-12a), 1.95 (1H, m, H-1a), 1.91 (1H, m, H-6a), 1.87 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-7a), 1.82 (1H, *J* = 3.8 Hz, H-7b), 1.79 (1H, m, H-2a), 1.76 (1H, m, H-6b), 1.69 (1H, m, H-14b), 1.54 (1H, m, H-2b), 1.41 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-12b), 1.32 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-5), 1.21 (1H, m, H-1b), 1.17 (3H, s, H-18), 1.03 (1H, m, H-3b), 0.78 (3H, s, H-20). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 177.8 (s, C-19), 161.6 (s, C-16), 140.3 (s, C-9), 125.7 (s, C-8), 109.4 (t, C-17), 78.9 (d, C-15), 53.0 (d, C-5), 50.9 (q, C-21), 43.6 (s, C-4), 42.2 (d, C-11), 41.2 (t, C-14), 40.4 (d, C-13), 38.6 (s, C-10), 37.6 (t, C-3), 35.5 (t, C-1), 32.9 (t, C-12), 31.6 (t, C-7), 28.1 (q, C-18), 20.3 (t, C-6), 19.0 (t, C-2), 16.9 (q, C-20). EIMS *m/z* (%): 330 ([M]<sup>+</sup>, 2); 315 (3), 235 (19), 189 (32), 175 (34), 173 (55), 159 (29), 145 (25), 135 (24), 129 (29), 117 (54), 105 (43), 95 (36). HREIMS 330.2184 (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup> 330.2195). IR ν<sub>max</sub> 3386, 2929, 1726, 1653, 1231, 1159, 1015, 897 cm<sup>-1</sup>. UV(CHCl<sub>3</sub>) λ<sub>max</sub> (log ε): 203.0 (3.62). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –35.85 (c 0.5, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.16. 15α-Acetoxy-grandiflorenic acid methyl ester (22)

17.7 mg (0.054 mmol) of compound **19** dissolved in the minimum amount of pyridine (105 μL) was treated with an excess of Ac<sub>2</sub>O (1 mL, 197 equiv) in the presence of catalytic amount of DMAP. The reaction mixture was stirred for 24 h, after elimination of solvent, compound **22** (19.9 mg, 100%) was obtained as an amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.45 (1H, s, H-15), 5.37 (1H, s, H-11), 5.20 (1H, s, H-17a), 5.16 (1H, s, H-17b), 3.63 (3H, s, H-21), 2.77 (1H, s, H-13), 2.07 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-20), 2.42–0.99 (15H, m). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 177.8 (s, C-19), 170.3 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 158.1 (s, C-9), 153.4 (s, C-16), 118.1 (d, C-11), 112.0 (t, C-17), 79.1 (d, C-15), 51.0 (q, C-21), 46.3 (d, C-5), 45.1 (s, C-4), 44.5 (s, C-8), 41.0 (t, C-14), 40.9 (t, C-1), 39.1 (d, C-13), 38.3 (s, C-10), 37.8 (t, C-3), 37.4 (t, C-12), 27.8 (q, C-18), 23.7 (q, C-20), 23.2 (t, C-7), 21.1 (q, OCOCH<sub>3</sub>), 20.0 (t, C-2), 17.7 (t, C-6). EIMS *m/z* (%): 372 ([M]<sup>+</sup>, 18), 357 (32), 313 (28), 312 (100), 297 (85), 253 (54), 237 (61), 197 (23), 183 (21), 173 (36), 172 (40), 157 (20), 145 (26), 143 (20), 131 (21), 129 (25), 105 (28), 93 (15). HREIMS: 372.2311 (calcd for C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup> 372.2301). IR ν<sub>max</sub> 2926, 2873, 1731, 1457, 1370, 1235, 1146, 1016, 979, 903 cm<sup>-1</sup>. UV(EtOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 201.8 (3.71). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +49.24 (c 0.8, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.17. 15-Oxo-grandiflorenic acid (23)

Compound **19** was oxidized following the same procedure described for **12**. Thus 42.3 mg of **19** (0.128 mmol) dissolved in DCM were treated with 84.7 mg of PDC (1.9 equiv) under N<sub>2</sub> atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. After filtration through florisil and evaporation of solvent the residue was purified by preparative-TLC using *n*-Hex/AcOEt 15% to render 13.7 mg of compound **23** (33%) as amorphous pale yellow solid. **23** showed identical spectroscopic data to those published.<sup>32</sup>

#### 4.1.18. Grandiflorenic acid benzyl ester (24)

To a solution of 75 mg of KOH (4 equiv) in dry acetone (5 mL) were added 100 mg (0.333 mmol) of grandiflorenic acid (**16**), and 82 μL of benzyl bromide (1 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature until disappearance of the starting acid (6 h). Then 40 mL of H<sub>2</sub>O were added and the aqueous phase was extracted several times with AcOEt. The organic phases were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography using *n*-Hex/AcOEt 5% to yield 119.5 mg of **24** (88%) as a pale yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.34 (5H, m, H-23–H-27), 5.22 (1H, s, H-11), 5.10 (2H, s, H-21), 4.91 (1H, s, H-17a), 4.79 (1H, s, H-17b), 2.76 (1H, s, H-13), 2.60 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-15), 1.21 (3H, s, H-18), 0.89 (3H, s, H-20), 2.50–0.96 (16H, m). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 176.9 (s, C-19), 158.2 (s, C-9), 155.7 (s, C-16), 136.0 (s, C-22), 128.8 (d, C-25), 128.6 (d, C-24), 128.3 (d, C-26), 127.9 (d, C-23), 127.8 (d, C-27), 114.6 (d, C-11), 105.3 (t, C-17), 65.9 (t, C-21), 50.1 (t, C-15), 46.5 (d, C-5), 44.7 (t, C-14), 44.7 (s, C-4), 42.0 (s, C-8), 41.1 (d, C-13), 40.6 (t, C-1), 38.5 (s, C-10), 38.3 (t, C-3), 37.7 (t, C-12), 29.5 (t, C-7), 28.0 (q, C-18), 23.5 (q, C-20), 20.0 (t, C-2), 18.4 (t, C-6). EIMS *m/z* (%): 390 ([M]<sup>+</sup>, 27), 375 (43), 299 (32), 239 (31), 211 (8), 173 (8), 155 (7), 145 (7), 131 (11), 117 (6), 105 (11), 91 (100). HREIMS: 390.2534 (calcd for C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup> 390.2559). IR ν<sub>max</sub> 2930, 2868, 1721, 1457, 1214, 1138, 874, 696 cm<sup>-1</sup>; UV(EtOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 202.8 (3.67). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +27.47 (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.19. Preparation of compound 25

The reduction of grandiflorenic acid was achieved following the same experimental procedure described for the obtention of derivative **9**. 61 mg (0.20 mmol) of grandiflorenic acid (**16**) were treated with a large excess of LiAlH<sub>4</sub> (250 mg, 32.4 equiv) to obtain 47 mg (81%) of the hydroxylated derivative **25** which showed identical spectroscopic data to those published.<sup>30</sup>

#### 4.1.20. 15α-Hydroxy-kaurenoic acid (27)

To a solution of 172.4 mg of **26** (0.461 mmol) in 3 mL of MeOH was added 1.28 mL of 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (1.5 equiv). The reaction mixture was refluxed for 24 h. Then the MeOH was removed, brine was added to the aqueous solution and it was extracted with DCM (3x 10 mL). The organic phases were collected and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then were filtered and concentrated. The resulting product (**27**) was obtained as an amorphous white solid (132.0 mg, 90%) and it showed spectroscopic data identical to grandiflorenic acid.<sup>33</sup>

#### 4.1.21. 15-Oxo-kaurenoic acid (28)

To 149.0 mg of **27** (0.469 mmol) in 10 mL of acetone at 0° C were added 180 μL of Jones reagent. The reaction was followed by TLC and it was quenched after 6 h with 2 mL of isopropanol. The reaction mixture was filtered through florisil and washed several times with AcOEt. Then the solvent was removed and the residue was purified by preparative-TLC using *n*-Hex/AcOEt (30%) to yield 42.3 mg of **28** (29%) as an amorphous white solid. **28** showed identical spectroscopic data to those reported.<sup>17</sup>

#### 4.1.22. Preparation of derivative 29

To a solution of **28** (22.2 mg, 0.070 mmol) in Et<sub>2</sub>O was added an excess of ethereal solution of CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (1 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. After elimination of solvent 26 mg of **29** were obtained (100%) as amorphous white solid. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.62 (2H, m, H-17a, H-22a), 3.65 (3H, s, H-21), 2.60 (2H, s, H-14), 2.38 (1H, s, H-13), 1.18 (3H, s, H-18), 0.93 (3H, s, H-20), 2.19–0.76 (16H, m). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 216.7 (s, C-15), 177.6 (s, C-19), 105.2 (s, C-16), 77.7 (t, C-22), 55.8 (d, C-5), 52.6 (s, C-8), 51.5 (d, C-9), 51.1 (q, C-21), 43.5 (s, C-4), 39.7 (s, C-10), 39.6 (t, C-1), 39.1 (d, C-13), 37.6 (t, C-3), 35.6 (t, C-7), 33.6 (t, C-14), 28.4 (q, C-18), 26.9 (t, C-12), 21.8 (t, C-6), 20.0 (t, C-17), 18.9 (t, C-2), 18.6 (t, C-11), 15.1 (q, C-20). EIMS *m/z* (%): 344 ([M]<sup>+</sup>–28, 100), 284 (43), 269 (28), 251 (17), 163 (43), 123 (50), 121 (56), 93 (33). HREIMS: 344.2353 (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>–28(N<sub>2</sub>) 344.2451). IR ν<sub>max</sub> 2928, 2870, 1724, 1447, 1232, 1158, 885, 462. UV(EtOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 211.0 (3.33). [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –436.2 (c 0.5 CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>–1</sup>.

#### 4.1.23. 15-Acetoxy-kaurenoic acid methyl ester (30)

A solution of 300 mg of compound **30** (0.833 mmol) in 10 mL of ethyl ether was treated with 1 mL of solution of CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> in Et<sub>2</sub>O. The reaction mixture was left at room temperature until disappearance of the starting material. After elimination of solvent a pale yellow oil was obtained (311.5 mg, 100%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.23 (1H, s, H-17a), 5.07 (2H, s, H-17b, H-15), 3.61 (3H, s, H-21), 2.76 (1H, s, H-13), 2.04 (3H, s, OCOCH<sub>3</sub>), 1.13 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, s, H-20), 2.16–0.77 (18H, m). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 177.6 (s, C-19), 170.7 (s, OCOCH<sub>3</sub>), 155.1 (s, C-16), 109.7 (t, C-17), 82.6 (d, C-15), 56.5 (d, C-5), 52.5 (d, C-9), 50.9 (q, C-21), 47.1 (s, C-8), 43.4 (s, C-4), 42.2 (d, C-13), 40.3 (t, C-1), 39.3 (s, C-10), 37.6 (t, C-3), 36.9 (t, C-7), 34.4 (t, C-14), 32.3 (t, C-12), 28.4 (q, C-18), 21.0 (q, OCOCH<sub>3</sub>), 20.6 (t, C-6), 18.8 (t, C-2), 18.1 (t, C-11), 15.3 (q, C-20). EIMS *m/z* (%): 374 ([M]<sup>+</sup>, 18), 359 (25), 332 (37), 315 (45), 314 (100), 299 (74), 273 (43), 257 (28), 255 (85), 254 (34), 239 (65), 173 (26), 159 (30), 147 (45), 145 (37), 135 (36), 133 (40), 131 (37), 123 (51), 121 (86), 119 (37), 117 (37), 109 (72), 107 (71), 105 (68), 95 (50), 93 (63). HREIMS: 374.2474 (calcd for C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup> 374.2457). IR ν<sub>max</sub> 2935, 2868, 1729, 1462, 1370, 1238, 1192, 1151, 1021, 993, 903 cm<sup>–1</sup>. UV(EtOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 202.0 (3.48) nm. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –53.96 (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.1.24. 16α-Hydroxy-kaurenoic acid methyl ester (32)

Following the same procedure for compound **30**, 145 mg of **31** in Et<sub>2</sub>O were treated with an excess of CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h. Then the solvent was removed and 151.3 mg (100%) of compound **32** were obtained. **32** showed identical spectroscopic data to those reported.<sup>34</sup>

#### 4.1.25. Preparation of compounds 33 and 34

To a solution of 178.5 mg of **32** (0.534 mmol) in dry DCM were added 46.7 μL of freshly distilled SOCl<sub>2</sub> (1.2 equiv) and 52 μL of pyridine (1.2 equiv) under N<sub>2</sub>. The reaction mixture was stirred under reflux for 3 h, until disappearance of the starting ester. Then H<sub>2</sub>O it was added and the mixture was extracted three times with DCM. The organic phases were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by chromatotron using *n*-hex/AcOEt 2%. 3.6 mg of **34** (2%) was isolated as amorphous white solid and a mixture of compounds **2** and **33**. This mixture was resolved using a silica gel column impregnated with AgNO<sub>3</sub>, and hexanes/toluene 60% as solvent. Thus, 16.9 mg of **2** (10%) and 42.6 mg of **34** (25%) were isolated as amorphous white solids.

Compound **33**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.64 (3H, s, H-21), 2.31 (1H, br s, H-13), 1.74 (3H, s, H-17), 1.16 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, s, H-20), 2.19–0.87 (20H, m). EIMS *m/z* (%): 352 ([M]<sup>+</sup>, 1), 316 (48),

301 (19), 273 (26), 257 (50), 241 (29), 187 (29), 149 (51), 133 (18), 123 (37), 121 (37), 109 (36), 106 (53), 105 (53), 97 (31), 94 (100), 91 (48). HREIMS: 352.2177 (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub><sup>35</sup>Cl [M]<sup>+</sup> 352.2169).

Compound **34**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5.06 (1H, s, H-15), 3.63 (3H, s, H-21), 2.30 (1H, s, H-13), 1.69 (3H, s, H-17), 1.16 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, s, H-20), 2.17–0.73 (18H, m). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 177.9 (s, C-19), 142.3 (s, C-16), 134.9 (d, C-15), 56.6 (d, C-5), 50.8 (q, C-21), 49.0 (s, C-8), 47.8 (d, C-9), 44.5 (d, C-13), 43.6 (s, C-4), 43.6 (t, C-7), 40.6 (t, C-1), 39.4 (s, C-10), 39.3 (t, C-14), 37.9 (t, C-3), 28.5 (q, C-18), 24.7 (t, C-12), 20.7 (t, C-6), 18.9 (t, C-2), 18.7 (t, C-11), 15.2 (q, C-20), 15.0 (q, C-17). EIMS *m/z* (%): 316 ([M]<sup>+</sup>, 58), 301 (12), 273 (14), 257 (28), 207 (22), 187 (24), 119 (19), 106 (40), 105 (33), 94 (100); 91 (25), 81 (15). HREIMS: 316.2411 (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup> 316.2402). IR ν<sub>max</sub> 2928, 2850, 1727, 1443, 1231, 1191, 1156, 814, 671 cm<sup>–1</sup>. UV(EtOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 205.0 (3.36) nm. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> –46.92 (c 0.9, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.2. Cell culture conditions

RAW 264.7, mouse leukemic macrophagic cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum), L-glutamine, and antibiotics. HT-29, human colorectal adenocarcinoma; HepG2, human hepatocellular carcinoma, and HeLa, human cervical adenocarcinoma cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, L-glutamine, and antibiotics.

#### 4.3. Assay of cell viability

Cells were incubated in the presence of different concentrations of derivatives for 24 h, before they were then reacted with MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) at 37 °C for 4 h. The reaction product, formazan, was extracted with dimethyl sulphoxide (DMSO) and the absorbance was read at 540 nm. Assays were performed in triplicate, and results are expressed as the percent reduction in cell viability compared to untreated control cultures for at least three independent experiments. IC<sub>50</sub> values refer to the concentration needed to inhibit 50% of cell viability in the presence of the compounds.

#### 4.4. Flow cytometry analysis of apoptosis and necrosis

After treatment with the appropriate stimuli, cells were stained with 0.005% (w/v) propidium iodide (PI) and immediately analyzed in a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson) according to a previously described protocol.<sup>35</sup> The percentages of apoptotic and necrotic cells were determined from a dot plot of forward scatter against PI fluorescence.<sup>36,37</sup>

#### 4.5. Cytosolic extracts and Western blot

Cytosolic extracts were prepared as previously described.<sup>38</sup> Protein content was estimated by the Bio-Rad protein assay. Protein extracts were subjected to SDS–PAGE (10–15% gels) and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes, which were incubated with the following antibodies: anti-β-actin, anti Bcl-xl, anti-Bcl-2, anti-p53, (all from Santa Cruz Biotechnology), anti-XIAP, anti-IAP-1, and anti-IAP-2 (all from BD Biosciences). After incubation with HRP-conjugated secondary antibody, protein bands were revealed with an enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare). β-Actin was used as a loading control.<sup>38</sup>

#### 4.6. Caspase assays

The activities of caspase-3, -8, and -9 were determined fluorimetrically in cytosolic protein extracts, using the substrates

Ac-DEVD-AMC, Ac-IETD-AFC, and Ac-LEHD-AFC, respectively, according to the suppliers' instructions (BD Biosciences).

#### 4.7. Statistical analysis

The data presented are shown as means  $\pm$  standard deviations (SD) of three independent experiments. Statistical significance was estimated by Student's *t* test for unpaired observations, with *P* < 0.05 considered significant. For Western blots, a linear correlation was observed between increasing amounts of input protein and signal intensity.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from PI05.0050, PI080070 and the Fundación Mutua Madrileña to S.H., and by a Santander-Complutense grant to S.H. and B. de las H. The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Pro-CNIC Foundation. This work has been also partly funded by the Spanish MICIN (Project SAF 2006-06720, SAF 2009-13296-C02-01) and Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC) to A.E.B. I.H.F. thanks the MEC for a predoctoral fellowship.

#### Supplementary data

Supplementary data (elemental analyses for kaurane derivatives) associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bmc.2009.11.064](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.11.064).

#### References and notes

- Song, Z.; Steller, H. *Trends Cell Biol.* **1999**, 9, M49.
- Nicholson, D. W. *Cell Death Differ.* **1999**, 6, 1028.
- Peter, M. E.; Krammer, P. H. *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, 10, 545.
- Enari, M.; Talanian, R. V.; Wong, W. W. *Nature* **1996**, 380, 723.
- Slee, E. A.; Adrain, C.; Martin, S. J. *Cell Death Differ.* **1999**, 6, 1067.
- Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J.; Yuan, J. *Cell* **1998**, 94, 491.
- Kim, R.; Tanabe, K.; Uchida, Y.; Emi, M.; Inoue, H.; Toge, T. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, 50, 343.
- (a) Newman, D. J. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2589; (b) Harvey, A. L. *Drug Discovery Today* **2008**, 13, 894; (c) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461.
- (a) Ravelo, A. G.; Estévez-Braun, A.; Chávez-Orellana, H.; Pérez Sacau, E.; Mesa-Siverio, D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4, 241; (b) Feher, M.; Schmidt, J. M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 218; (c) Grabowski, K.; Schneider, G. *Curr. Chem. Biol.* **2007**, 1, 115; (d) Henkel, T.; Brunne, R. M.; Müller, H.; Reichel, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, 38, 643.
- (a) Larsson, J.; Gottfries, J.; Bohlin, L.; Backlund, A. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 985; (b) Rosen, J.; Gottfries, J.; Muresan, S.; Backlund, A.; Oprea, T. I. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 1953.
- (a) Koehn, F. E.; Carter, G. I. *Nat. Rev.* **2005**, 4, 206; (b) McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. *Phytochemistry* **2007**, 68, 2015.
- (a) Takahashi, N.; Kawada, T.; Goto, T.; Tamamoto, T.; Taimatsu, A.; Matsui, N.; Kimura, K.; Saito, M.; Hosokawa, M.; Miyashita, K.; Fushiki, T. *FEBS Lett.* **2002**, 514, 315; (b) Salminen, A.; Lehtonen, M.; Suuronen, T.; Kaarniranta, K.; Huuskonen, J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 2979; (c) Rabi, T.; Bishayee, A. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, 115, 223.
- Andrianasolo, E. H.; Haramaty, L.; Degenhardt, K.; Mathew, R.; White, E.; Lutz, R.; Falkowski, P. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 1551.
- Duarte, N.; Varga, A.; Cherepnev, G.; Radics, R.; Molnar, J.; Ferreira, M. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 546.
- Yang, L.; Wu, D.; Luo, K.; Wu, S.; Wu, P. *Cancer Lett.* **2009**, 276, 180.
- Nagashima, F.; Kondoh, M.; Kawase, M.; Simizu, S.; Osada, H.; Fujii, M.; Watanabe, Y.; Sato, M.; Asakawa, Y. *Planta Med.* **2003**, 69, 377.
- Ruiz, Y.; Rodríguez, J.; Arvelo, F.; Usubillaga, A.; Monsalve, M.; Diez, N.; Galindo-Castro, I. *Phytochemistry* **2008**, 69, 432.
- De las Heras, B.; Hortelano, S.; Giron, N.; Bermejo, P.; Rodríguez, B.; Bosca, L. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 152, 249.
- (a) Giron, N.; Traves, P. G.; Rodríguez, B.; Lopez-Fontal, R.; Bosca, L.; Hortelano, S.; De las Heras, B. *Pharmacology* **2008**, 228, 179; (b) Diaz-Viciedo, R.; Hortelano, S.; Giron, N.; Masso, J. M.; Rodríguez, B.; Villar, A.; De las Heras, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 369, 761; (c) De las Heras, B.; Hortelano, S.; Giron, N.; Bermejo, P.; Rodríguez, B.; Bosca, L. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 152, 249; (d) Traves, P. G.; Hortelano, S.; Zeini, M.; Chao, T. H.; Lam, T.; Neuteboom, S. T.; Theodorakis, E. A.; Palladino, M. A.; Castrillo, A.; Bosca, L. *Mol. Pharmacol.* **2007**, 71, 1545; (e) Castrillo, A.; De las Heras, B.; Hortelano, S.; Rodríguez, B.; Villar, A.; Bosca, L. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 15854; (f) De las Heras, B.; Abad, M. J.; Silvan, A. M.; Pascual, R.; Bermejo, P.; Rodríguez, B.; Villar, A. M. *Life Sci.* **2001**, 70, 269; (g) Fernandez, M. A.; Tornos, M. P.; García, M. D.; De las Heras, B.; Villar, A. M.; Saenz, M. T. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53, 867; (h) Navarro, A.; De las Heras, B.; Villar, A. *Planta Med.* **2000**, 289; (i) De las Heras, B.; Navarro, A.; Diaz-Guerra, M. J.; Bermejo, P.; Castrillo, A.; Bosca, L.; Villar, A. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 128, 605.
- (a) Torrenegra, R. D.; Tellez, A.; Alba, N.; Garcia, G. *Rev. Colomb. Quím.* **1994**, 23, 29; (b) Usubillaga, A.; De Hernandez, J.; Perez, N.; Kiriakidis, M. *Phytochemistry* **1973**, 12, 2999; (c) Usubillaga, A.; Morales, A. *Phytochemistry* **1972**, 11, 1856; (d) Cuatrecasas, J. *Phytologia* **1976**, 35, 43; (e) Usubillaga, A.; Romero, M.; Aparicio, R. *Acta Hort.* **2003**, 597, 129.
- (a) Xiang, W.; Li, R. T.; Wang, Z. Y.; Li, S. H.; Zhao, Q. S.; Zhang, H. J.; Sun, H. D. *Phytochemistry* **2004**, 65, 1173; (b) Li, X.; Xiao, W.; Pu, J.; Ban, L.; Shen, Y.; Weng, Z.; Li, S.; Sun, H. *Phytochemistry* **2006**, 67, 1336.
- Scifinder was used in the searching.
- Lyss, G.; Knorre, A.; Schmidt, T. J.; Pahl, H. L.; Merfort, I. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 33508.
- Batista, R.; Chiari, E.; Oliveira, A. B. *Planta Med.* **1999**, 65, 283.
- Pyrek, J. P. *Tetrahedron* **1970**, 26, 5029.
- (a) Bohlmann, F.; Schmeda-Hirschmann, G.; Jakupovic, J. *Phytochemistry* **1984**, 23, 1435; (b) Bohlmann, F.; Adler, A.; Schuster, A.; Gupta, R. J.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1981**, 20, 1899.
- Wu, Y. C.; Hung, Y. C.; Chang, F. R.; Cosentino, M.; Wang, H. K.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 635.
- (a) Oliveira, A. B.; Hanson, J.; Takahashi, J. A. *Phytochemistry* **1995**, 40, 439; (b) Boaventura, M. A. D.; Oliveira, A. B.; Hanson, J.; Hitchcock, P. B.; Takahashi, J. A. *Phytochemistry* **1995**, 40, 1667.
- Ellmauerer, E.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Scott, R. J. *Nat. Prod.* **1987**, 50, 5973.
- Piozzi, F.; Passannanti, S.; Marino, M. L.; Sprio, V. *Can. J. Chem.* **1972**, 50, 109.
- (a) Anjaneyulu, A. S. R.; Rao, V. L. *Phytochemistry* **2003**, 62, 1207; (b) Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; Schuster, A.; King, R. M.; Robinson, H. *Phytochemistry* **1982**, 21, 2317.
- Fraga, B. M.; Cabrera, I.; Amaro-Luis, J. M. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1953.
- Hutchison, M.; Lewer, P.; MacMillan, J. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 2363.
- Pradhan, B. P.; Chakraborty, S.; Ghosh, R. K.; Roy, A. *Phytochemistry* **1995**, 39, 1399.
- Hortelano, S.; Zeini, M.; Castrillo, A.; Alvarez, A. M.; Bosca, L. *Cell Death Differ.* **2002**, 9, 643.
- Genaro, A. M.; Hortelano, S.; Alvarez, A.; Martinez, C.; Bosca, L.; Splenic, B. *J. Clin. Invest.* **1995**, 95, 1884.
- Hortelano, S.; Bosca, L. *Mol. Pharmacol.* **1997**, 51, 414.
- Zeini, M.; Traves, P. G.; Lopez-Fontal, R., et al. *J. Immunol.* **2006**, 177, 3327.